



UNIwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Instytut Pediatrii

Klinika Pneumologii, Alergologii Dziecięcej i Immunologii Klinicznej

Pracownia Badań Komórkowych i Molekularnych

ul. Szpitalna 27/33  
60-572 Poznań

tel.: 61 8547643  
fax: 61 8547663  
e-mail: alszczep@ump.edu.pl

Prof. dr hab. n. med. Aleksandra Szczepankiewicz  
Kierownik Pracowni Badań Komórkowych i Molekularnych  
Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Poznań, 20.06.2023

### **Recenzja rozprawy doktorskiej**

Lek. Karola Rogowskiego

pt. „Ocena modulacyjnego działania tamoksyfenu na ekspresję i funkcję sparowanych immunoreceptorów kwasu sjałowego Siglec-5/14 w komórkowym modelu raka piersi”

Promotor: Dr hab. Przemysław Wielgat

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska została zrealizowana pod kierunkiem dr hab. Przemysława Wielgata w Zakładzie Farmakologii Klinicznej Wydziału Lekarskiego z Oddziałem Stomatologii i Oddziałem Nauczania w Języku Angielskim Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku. Podstawę formalną wykonania recenzji stanowi uchwała Komisji Doktorskiej z dnia 25.04.2023r.

Dokonując oceny przedstawionej rozprawy doktorskiej należy przede wszystkim wskazać na trafność wyboru jej tematu. Nowotwory piersi są najczęściej występującym nowotworem u kobiet i wiążą się z wysoką śmiertelnością. Zachorowalność wrasta z wiekiem, aż 80% zachorowań dotyczy pacjentek po ukończeniu 50 roku życia, a biorąc pod uwagę wydłużenie średniej długości życia, diagnostyka i leczenie tego nowotworu stanowi poważne wyzwanie medyczne. W związku z tym niezwykle istotne jest poszukiwanie nowych rozwiązań

terapeutycznych, nie tylko ukierunkowanych na komórki nowotworowe, ale również na mikrośrodowisko guza, w tym odpowiedź immunologiczną. Najnowsze badania wykazały, że mechanizmy rozwoju nowotworów obejmują nie tylko zmiany wewnątrzkomórkowe, ale dotyczą również oddziaływania komórek nowotworowych z otaczającym środowiskiem, co istotnie wpływa na progresję nowotworu, jego zdolność przerzutowania oraz rokowanie i efekty terapii. W piśmiennictwie światowym dotyczącym wpływu selektywnych modulatorów receptora estrogenowego na efekty leczenia nowotworów piersi, wiele uwagi w ostatnich latach poświęcono badaniu potencjału immunomodulacyjnego tych leków oraz ich wpływu na mikrośrodowisko guza, szczególnie komórki układu odpornościowego. W interakcjach między układem odpornościowym a komórkami nowotworowymi istotną rolę pełnią immunoreceptory odpowiedzialne za aktywację lub supresję odpowiedzi immunologicznej w zależności od zmian w glikozylacji i sialilacji powierzchni komórek nowotworowych, co pozwala tym ostatnim uniknąć nadzoru immunologicznego. Szczególnie istotną grupą są receptory Siglec, które wpływają na aktywność układu odpornościowego poprzez sjalowane ligandy. Temat rozprawy doktorskiej wpisuje się zatem w ogólnoświatowy trend badawczy i podejmuje próbę oceny, czy terapia selektywnym modulatorem receptora estrogenowego, tamoksyfenem, modyfikuje aktywność immunologiczną monocytów oraz ekspresję i funkcję receptorów Siglec 5 i 14 w monocytach hodowanych zarówno w monokulturze jak i kokulturze komórek raka piersi estrogeno-zależnych i niezależnych od receptorów estrogenowych w warunkach *in vitro*.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska ma typowy układ, liczy łącznie z piśmiennictwem 134 strony, z tego 38 stron stanowi „Wstęp”, 1 strona „Cele pracy” „Materiały i metody” – 13 stron, „Wyniki” – 25 stron, „Dyskusja” – 11 stron, „Wnioski” – 1 strona. Na końcu zamieszczono też streszczenie w języku polskim i angielskim, wykaz piśmiennictwa liczący 260 pozycji literaturowych oraz wykaz tabel i rycin. Została zachowana właściwa proporcja między poszczególnymi częściami rozprawy doktorskiej, a obszerny wykaz pozycji piśmiennictwa zawiera najnowsze doniesienia z tematyki rozprawy. Na uznanie zasługuje jasny i przejrzysty styl pracy, a zilustrowanie opisywanych procesów immunologicznych oraz wyników licznymi rycinami ułatwia zrozumienie głównych założeń oraz efektów rozprawy. Praca jest napisana poprawną polszczyzną, bez znaczących uchybień edytorskich.

Rozprawę doktorską rozpoczyna dobrze napisany i bardzo obszerny Wstęp, który wprowadza w zagadnienia poruszane w pracy. Na początku Doktorant opisuje epidemiologię raka piersi, wskazuje najczęstsze czynniki ryzyka, omawia parametry będące podstawą klasyfikacji raka piersi, przy czym, biorąc pod uwagę cel i zakres badań zaplanowanych w rozprawie, ten podrozdział jest zbyt obszerny. Następnie Doktorant opisuje dostępne metody

terapii, w tym hormonoterapię nowotworów złośliwych wykazujących ekspresję receptorów estrogenowych i progesteronowych z uwzględnieniem selektywnych modulatorów receptora estrogenowego takich jak tamoksyfen, którego działanie zbadano w niniejszej rozprawie. Następnie Doktorant szczegółowo omawia rolę układu odpornościowego w procesie kancerogenezy oraz rolę poszczególnych komórek (limfocytów T, makrofagów, komórek NK czy komórek dendrytycznych) w zwalczaniu komórek nowotworowych. Następnie opisano receptory Siglec, ich klasyfikację, ekspresję w układzie krwiotwórczym oraz szlaki sygnalizacji aktywujących i hamujących receptorów błonowych. Kolejny podrozdział Wstępu zawiera opis roli receptorów Siglec w układzie odpornościowym oraz w procesie kancerogenezy. Na zakończenie Doktorant opisuje budowę, dystrybucję i rolę sparowanych immunoreceptorów Siglec-5/14 w regulacji odpowiedzi immunologicznej. Dane z piśmiennictwa zawarte we Wstępie są dobrane właściwie i prawidłowo cytowane i wskazują na dużą znajomość tematu i przygotowanie merytoryczne Doktoranta do prowadzenia badań eksperymentalnych. Zakończenie Wstępu pozostawia pewien niedosyt jeśli chodzi o podsumowanie dotychczasowego stanu wiedzy oraz wskazanie na luki w wiedzy i niejasności, które skłoniły Doktoranta do podjęcia badań.

Celem pracy była ocena wpływu tamoksyfenu na aktywność komórek układu odpornościowego na przykładzie monocytów oraz udziału sparowanych receptorów Siglec-5/14 w procesie nadzoru immunologicznego w modelu *in vitro* nowotworu piersi. Wśród celów szczegółowych Doktorant wymienił zbadanie cytotoksycznego wpływu różnych stężeń tamoksyfenu na zastosowany model komórkowy, wpływu tamoksyfenu na aktywność immunologiczną monocytów i na ekspresję receptorów Siglec 5 i 14 oraz na interakcje sparowanych receptorów Siglec-5/14 z błonami komórek nowotworowych w hodowli. Założone cele zostały osiągnięte w pracy.

Kolejny rozdział, Materiały i metody, zawiera opis materiału badawczego, wykaz odczynników, sprzętu oraz metody zastosowane przy realizacji pracy. Prace badawcze zostały dobrze zaplanowane i wykonane z dużą starannością, a Doktorant weryfikował hipotezę badawczą z wykorzystaniem nowoczesnych technik biologii komórki oraz biologii molekularnej w modelu komórkowym nowotworu piersi. W toku pracy Doktorant przeprowadził m.in. hodowle komórek raka piersi oraz monocytów w monokulturze i kokulturze, wykonał test oceny żywotności komórek, test migracji, ilościowy PCR w czasie rzeczywistym (qPCR), ocenił ekspresję sparowanych receptorów oraz wiązanie białek fuzyjnych Siglec-5 i Siglec-14 Fc do komórek nowotworowych metodą cytometrii przepływowej. Opis metod zilustrowano rycinami, co ułatwia zrozumienie schematu

doświadczalnego. Zawarte w tym rozdziale szczegółowe opisy wykonywanych procedur pozwalają stwierdzić trafność wyboru metod badawczych do zweryfikowania hipotezy badawczej oraz wskazują na duży wkład pracy Doktoranta w realizację części eksperymentalnej rozprawy. Na uwagę zasługuje kompleksowa analiza cytometryczna zastosowana nie tylko do oceny stężenia cytokin w supernatantach z hodowli komórkowej, ale również do oceny markerów różnicowania monocytów i analizy ich fenotypu immunologicznego oraz do oceny ekspresji sparowanych receptorów Siglec po ekspozycji na tamoksyfen. Doskonałym uzupełnieniem tej części rozprawy jest analiza funkcjonalna i ocena wiązania białek fuzyjnych Siglec-5 Fc i Siglec-14 Fc z komórkami nowotworowymi wystawionymi na działanie tamoksyfenu. Przejrzystość niektórych podrozdziałów zwiększyłoby przedstawienie części opisów w formie tabel (np. skład mieszanin reakcyjnych i warunki reakcji amplifikacji w podrozdziale opisującym ilościowy PCR). W opisie metodyki zbyt skrótowo potraktowano podrozdział opisujący analizę statystyczną wyników, wskazano jedynie test oraz pakiet statystyczny, brakuje jednak wyjaśnienia, dlaczego zastosowano test jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA (czy wykonano ocenę zgodności rozkładu danych z rozkładem normalnym, analizę jednorodności wariancji) oraz kryterium wyboru testu *post hoc*.

Rozdział „Wyniki” charakteryzuje uporządkowany opis wyników przeprowadzonych badań dodatkowo zilustrowanych licznymi rycinami. Zawartość tego rozdziału, bogactwo zdjęć i wykresów wykorzystanych do przedstawienia uzyskanych wyników oraz opis wyników poszczególnych eksperymentów są dowodem na bardzo dobre opanowanie warsztatu badawczego przez Doktoranta. Do najważniejszych wyników rozprawy należy zaliczyć obserwacje, że tamoksyfen hamuje wzrost i migrację komórek linii MCF-7 w mono- i kokulturze oraz wpływa na zmiany w profilu cytokin i polaryzacji monocytów linii THP-1 w obecności komórek nowotworowych. Doktorant wykazał ponadto zmiany w ekspresji sparowanych receptorów Siglec-5/14 niezależnie od fenotypu biologicznego komórek nowotworowych pod wpływem tamoksyfenu. Doktorant nie ustrzegł się jednak pewnych nieścisłości. W opisie wyników dotyczących oceny potencjału migracyjnego komórek raka piersi Doktorant zastosował test migracyjny, i jako synonim tego testu stosuje zamiennie test „gojenia rany”. Biorąc pod uwagę sposób wykonania testu, nie jest to właściwe określenie, ponieważ w teście migracyjnym komórki rosną w dwóch osobnych grupach obok siebie, natomiast monowarstwa nie ulegają uszkodzeniu charakterystycznemu dla testów związanych z uszkodzeniem np. mechanicznym. Stąd procesy komórkowe leżące u podłoża testu migracyjnego różnią się od procesów związanych z gojeniem rany/naprawą uszkodzenia

monowarstwy i w związku z tym nie powinny być stosowane jako synonimy. Wśród braków tego rozdziału należy również wymienić brak skali na rycinach przedstawiających zdjęcia mikroskopowe komórek (ryciny 20 i 22), a w opisie legendy powinna się znaleźć informacja, jakiego powiększenia użyto do przedstawienia zdjęć, bez tych informacji trudno jednoznacznie zinterpretować uzyskane wyniki. Ponadto, w opisie wyników na stronie 70 błędnie odesłano czytelnika do ryciny 23 A-F, powinna być rycina 24 A-F.

W rozdziale „Dyskusja” Doktorant przeanalizował znaczenie uzyskanych wyników w kontekście dostępnej literatury. Omówienie wyników Doktorant rozpoczyna od uzasadnienia wyboru linii komórek nowotworowych do badań (zależne i niezależne od receptorów estrogenowych) oraz uzasadnia wybór stężenia tamoksyfenu (10  $\mu\text{M}$ ) do analiz. W kontekście uzyskanych wyników wybór ten wydaje się właściwy dla linii komórkowej MCF-7 (rycina 17), ale jest dość zaskakujący w przypadku linii MDA-MB-231 w mono- i kokulturze z monocytami (rycina 18) oraz dla samych monocytów (tu przeżywalność w mono- i kokulturze z obiema liniami nowotworowymi spada istotnie dopiero przy stężeniu 50  $\mu\text{M}$ , rycina 19), o czym Doktorant wspomina, ale nie komentuje tych wyników. Proszę zatem Doktoranta o komentarz dotyczący wyboru stężenia 10  $\mu\text{M}$  tamoksyfenu do dalszych analiz we wszystkich układach eksperymentalnych. W następnej części Dyskusji Doktorant umiejętnie dyskutuje znaczenie wyników dotyczących ekspresji CD38 oraz arginazy-1 w badanych układach doświadczalnych, wskazując na pewne sprzeczności między doniesieniami klinicznymi, które informują o niekorzystnym rokowaniu przy wysokiej ekspresji CD38 w makrofagach, i konfrontuje je z wynikami rozprawy doktorskiej, które wskazują, że wyższa ekspresja CD38 w kokulturze zwiększa wrażliwość monocytów na tamoksyfen i promuje ich właściwości prozapalne. Za wartościowy fragment Dyskusji należy również uznać próbę wyjaśnienia przez Doktoranta obserwacji dotyczącej uzyskania efektu terapeutycznego tamoksyfenu niezależnie od fenotypu komórek nowotworu piersi (zależne i niezależne od receptorów estrogenowych), w której Doktorant wskazuje na potencjalne wykorzystanie mechanizmu „off-target” tamoksyfenu w terapii nowotworów piersi niezależnych od estrogenów i umiejętnie wskazuje na możliwy mechanizm molekularny tego efektu oraz jego immunostymulujące działanie w kontekście wyników uzyskanych dla receptorów Siglec. Następnie Doktorant szeroko dyskutuje znaczenie obserwacji dotyczących udziału receptorów Siglec-5 i 14 w immunomodulacji pod wpływem tamoksyfenu.

Zakończenie Dyskusji stanowi zwięzłe podsumowanie rozważań dotyczących immunomodulacyjnego działania tamoksyfenu w badanym modelu doświadczalnym oraz możliwości wykorzystania profilu ekspresji receptorów Siglec jako narzędzia do

prognozowania progresji nowotworu oraz weryfikacji terapii przeciwestrogenowej. Czytanie tego rozdziału pracy ułatwiło omówienie znaczenia wyników w tej samej kolejności, w której zaprezentowano wyniki we wcześniejszym rozdziale. Dyskusja przeprowadzona jest w sposób systematyczny i zawiera krytyczną ocenę własnych wyników w odniesieniu do aktualnych pozycji piśmiennictwa, co świadczy o bardzo dobrej znajomości zagadnienia i dojrzałości naukowej Autora.

Rozprawę kończy pięć wniosków, jednak pierwsze cztery stanowią raczej zwięzłe podsumowanie uzyskanych wyników. Warto byłoby uzupełnić te podsumowania o wskazanie znaczenia tych wyników, co Doktorant doskonale sformułował w ostatnim, piątym wniosku (np. dla wniosku 3 warto skomentować, jakie znaczenie ma obserwacja wyższej ekspresji sparowanych receptorów Siglec-5/14 w monocytach hodowanych w obecności komórek nowotworu piersi; dla wniosku 4 warto wskazać, jak można wykorzystać wiedzę o wpływie tamoksyfenu na aktywność transkrypcyjną genów SIGLEC5 i 14 oraz pozostałych badanych genów w monocytach niezależnie od układu komórkowego. Warto byłoby również wskazać we wniosku 1 i 2 konkretne stężenie tamoksyfenu, które było przedmiotem analiz.

Tekst rozprawy został przygotowany poprawnie merytorycznie i logicznie. Pomimo kilku uwag natury porządkującej, pragnę podkreślić, że nie zmniejszają one wartości merytorycznej zarówno przeprowadzonych badań jak i wnioskowania. Na szczególną uwagę zasługuje fakt, że tak kompleksowa praca eksperymentalna w laboratorium na pewno wymagała dużego nakładu pracy i czasu od lekarza klinicysty, tym większe uznanie dla zaangażowania Doktoranta w pracę badawczą, by osiągnąć założony cel. Praca jest nowatorska i wskazuje, jak istotne są badania nad modyfikacją mikrośrodowiska guza, szczególnie wykorzystanie potencjału immunomodulacyjnego dostępnych leków, takich jak tamoksyfen, w poprawie efektów terapii raka piersi.

W świetle przedstawionej oceny stwierdzam, że rozprawa doktorska lek. Karola Rogowskiego spełnia wszystkie wymogi stawiane rozprawom na stopień naukowy doktora określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2022 r. poz. 574). W związku z tym zwracam się z wnioskiem do Senatu Uniwersytetu Medycznego z Białymstoku o dopuszczenie Pana lek. Karola Rogowskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Aleksandra Szczepankiewicz

Prof. dr hab. Aleksandra Szczepankiewicz