



Warszawa, 20.09.2022

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr inż. Jagody Mierzejewskiej p.t. „*Wpływ zastosowania komórek dendrytycznych transdukowanych lentiwirusowymi nośnikami genów IL-12 i IL-18 na aktywację odpowiedzi przeciwnowotworowej w modelu mysiego raka jelita grubego MC38*”

wykonanej w Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk (PAN) pod kierunkiem promotora Pani dr hab. Elżbiety Pajtasz-Piaseckiej prof. PAN

Wykorzystanie komórek układu immunologicznego, w tym komórek dendrytycznych, do walki z chorobą nowotworową to bardzo obiecujący kierunek terapii we współczesnej medycynie. W celu zwiększenia skuteczności szczepionek na bazie komórek dendrytycznych moduluje się ich właściwości poprzez m.in. transfekcje mRNA lub z wykorzystaniem wektorów wirusowych. Bardzo dobre efekty terapeutyczne daje też zastosowanie szczepionek łącznie z inhibitorami immunologicznych punktów kontrolnych lub chemioterapią. Zatem wybór tematu rozprawy mgr inż. Jagody Mierzejewskiej jest w pełni uzasadniony i wpisuje się w nowatorskie badania dotyczące skojarzonej immunoterapii przeciwnowotworowej.

Przedstawiona do recenzji praca ma układ klasyczny i składa się ze streszczenia w języku polskim i angielskim, wykazu skrótów, wstępu, opisu założeń i celu pracy oraz wykorzystanych materiałów i metod, wyników, dyskusji, wniosków oraz spisu rycin, tabel i piśmiennictwa. Praca została sfinansowana przez Narodowe Centrum Nauki w ramach grantu „Preludium”, a w ramach projektu doktorantka opublikowała artykuł oryginalny, którego jest pierwszym autorem.

Praca jest bardzo dobrze napisana, przejrzystym i poprawnym językiem, co sprawia, że z łatwością można śledzić informacje w niej zawarte. Pojawiają się nieliczne błędy jak zastosowanie zwrotu komórki odpornościowe zamiast komórki układu odpornościowego (str. 23), jednak nie wpływają one na ogólny odbiór pracy. Doktorantka wykorzystwała w pracy bogatą bazę danych literaturowych, co świadczy o bardzo dobrej znajomości tematyki oraz dojrzałym warsztacie badawczym.

We wstępie Autorka opisuje biologię oraz funkcje komórek dendrytycznych w kształtowaniu odpowiedzi immunologicznej poprzez polaryzację odpowiedzi komórkowej. Następnie przedstawia rolę komórek układu odpornościowego w procesie nowotworzenia oraz znaczenie komórek o charakterze immunosupresorowym w mikrośrodkowisku guzów litych. Autorka szczegółowo opisuje aktywność interleukiny 12 (IL-12) i interleukiny 18 (IL-18)



w zwalczaniu nowotworu, podkreślając zakres ich współdziałania za pomocą ryciny. Następnie Doktorantka przechodzi do wyjaśnienia założeń immunoterapii przeciwnowotworowej z wykorzystaniem komórek dendrytycznych i ograniczeń tej formy terapii, wskazując kierunki poprawy skuteczności leczenia poprzez m.in. zastosowanie komórek dendrytycznych transdukowanych do produkcji IL-12 i/lub IL-18 w obrębie nowotworu. Wstęp kończy opis immunomodulujących właściwości cyklofosfamidu, cytostatyku, który w niskiej dawce zwiększa efektywność szczepionek w terapii skojarzonej m.in. poprzez korzystny wpływ na aktywność limfocytów T, co zostało zilustrowane stosowną ryciną.

W dalszej części pracy, po krótkim uzasadnieniu problematyki badawczej, Autorka formułuje cel pracy, który został podzielony na cztery oddzielne zadania badawcze, składające się w spójną całość.

Rozdział Materiały i Metody jest dość obszerny i obejmuje szczegółowe informacje o sposobie przeprowadzenia eksperymentów, wykorzystanych komórkach i ich uzyskiwaniu oraz sposobie analizowania danych. Informacje o wykorzystanych do analiz odczynnikach i przeciwciałach są dobrze uporządkowane i przedstawione w postaci przejrzystych tabel. Jasno i zrozumiale opisane są doświadczenia, zarówno *in vitro* jak i immunoterapeutyczne *in vivo* z wykorzystaniem myszy laboratoryjnych; bardzo pomocne w tym zakresie są szczegółowe schematy doświadczeń.

Wyniki przeprowadzonych badań zostały zaprezentowane w 4 podrozdziałach korespondujących z zadaniami badawczymi określonymi w rozdziale 2. założenia i cel pracy. Pozwala to jasno stwierdzić, że cel pracy został zrealizowany. Wyniki stanowią najbardziej obszerną część pracy, a po każdym podrozdziale Autorka umieściła zwięzłe podsumowanie, które pozwala na uporządkowane śledzenie wyników. Ze względu na mnogość uzyskanych wyników, na które składają się łącznie 82 ryciny, w podrozdziale piątym Doktorantka zdecydowała się umieścić streszczenie wyników, z wyróżnieniem tego co było w nich najważniejsze.

W pierwszym podrozdziale Wyników Autorka przedstawiła charakterystykę komórek dendrytycznych transdukowanych do produkcji cytokin. Potwierdziła wydajność transdukcji na poziomie około 71% oraz zwiększoną ekspresję mRNA dla IL-12 i IL-18 jak i sekrecję tych cytokin po zastosowaniu wektorów lentiwirusowych niosących geny odpowiednio dla IL-12 i IL-18. Doświadczenia przeprowadzono w dwóch wariantach: 1) komórki szczepionkowe niestymulowane oraz 2) stymulowane antygenami nowotworowymi (TAg). Co ciekawe badania wykazały, że transdukcja komórek dendrytycznych za pomocą dwóch wektorów niosących geny IL-12 lub IL-18 była bardziej wydajna niż jednym wektorem niosącym sekwencję obu genów jednocześnie, co spowodowało eliminację tej konfiguracji z dalszych badań. Doktorantka potwierdziła również, że transdukowane komórki dendrytyczne stymulowane TAg, aktywują limfocyty T i komórki NK, zwiększając ich cytotoksyczność i sekrecję INF- γ i IL-10 w warunkach *ex vivo*.



W kolejnych podrozdziałach Autorka opisała aktywność transdukowanych komórek dendrytycznych *in vivo* w modelu mysiego raka jelita grubego. W pierwszej kolejności przedstawiła ich zdolność do naciekania tkanki nowotworowej, która okazała się istotnie wyższa jedynie dla DC transdukowanych dwoma wektorami (niosącymi geny dla IL-12 i IL-18) 3 dni po ich jednokrotnym, okołoguzowym podaniu. Następnie opisała ich zdolność do migracji do wartowniczych węzłów chłonnych, która okazała się z kolei najwyższa dla komórek nietransdukowanych, ale stymulowanych TAg. To właśnie stymulację antygenową *ex vivo* Autorka uznała za korzystny czynnik zwiększający mobilność komórek dendrytycznych.

W kolejnych doświadczeniach, zanim jeszcze Doktorantka określiła efekt przeciwnowotworowy opracowanych szczepionek, przeprowadziła bardzo szczegółową ocenę tzw. kinetyki indukowania odpowiedzi przeciwnowotworowej w 3 punktach czasowych, w guzach i wartowniczych węzłach chłonnych po jednokrotnym podaniu transdukowanych DC (ponownie w dwóch wariantach niestymulowanych i stymulowanych TAg). Ocena oparta była na analizie wybranych subpopulacji limfoidalnych (czyli limfocytów T CD4⁺ i CD8⁺, komórek NK i NKT) i mieloidalnych (DC i makrofagi). Ponadto, analizie podlegały też splenocyty uzyskane ze śledziony myszy; określono zmiany odsetka subpopulacji komórek limfoidalnych i DC oraz oceniono aktywność cytotoksyczną i produkcję cytokin po re-stymulacji komórkami nowotworowymi MC38. Na zakończenie Autorka porównała wyniki działania transdukowanych DC niestymulowanych lub stymulowanych TAg w ostatnim punkcie czasowym tj. w 7 dniu po ich podaniu. Uzyskane na tym etapie wyniki pozwoliły wybrać do dalszych doświadczeń terapeutycznych komórki dendrytyczne w wariacie, gdzie stosowano stymulacje TAg, określone przez Autorkę jako „modyfikowane DC” (str. 127). Jest to nieco mylące, i w mojej opinii niepotrzebnie wprowadzone określenie, gdyż po pierwsze klarowny opis wyników i rycin pozwala zorientować się czy prezentowane dane dotyczą DC stymulowanych TAg czy nie, a po drugie jest stosowane niekonsekwentnie gdyż w Dyskusji Doktoranta używa zwrotu „modyfikowane DC” w odniesieniu po prostu do transdukowanych komórek dendrytycznych. Jest to drobny błąd przy bardzo klarownie i czytelnie opisanych wynikach.

Ponadto, uzyskane dane pozwoliły stwierdzić, że jednokrotne podanie transdukowanych dwoma wektorami komórek dendrytycznych stymulowanych TAg pobudza miejscową odpowiedź przeciwnowotworową, ale nie wystarcza do pobudzenia odpowiedzi ogólnoustrojowej. W doświadczeniach terapeutycznych zastosowano zatem schemat trzykrotnego podania transdukowanych komórek DC.

Ostatnie dwa podrozdziały Wyników poświęcone są przedstawieniu wyników złożonych doświadczeń terapeutycznych z zastosowaniem immunoterapii i chemioimmunoterapii. Oprócz monitorowania wzrostu guzów u myszy poddanych terapii Doktoranta oceniła również miejscową oraz ogólnoustrojową odpowiedź przeciwnowotworową za pomocą wieloparametrowej analizy z wykorzystaniem cytometrii przepływowej. To kompleksowe podejście do badanego zagadnienia



zasługuje na szczególne uznanie i świadczy o wszechstronności Doktorantki oraz dużej wiedzy z zakresu immunoonkologii.

Doktorantka wykazała, że dwukrotne podanie komórek szczepionkowych transdukowanych dwoma wektorami (dla IL-12 i IL-18) wywołało najszybsze i największe zahamowanie wzrostu guzów, a trzykrotne zastosowanie szczepionek nie przedłużyło efektu terapeutycznego. Jednakże, po trzykrotnym podaniu szczepionek z jednym wektorem (IL-12 lub IL-18) efekt był korzystniejszy niż w przypadku DC zdolnych do produkcji obu cytokin jednocześnie. W związku z tymi wynikami chciałabym prosić o próbę wytłumaczenia mechanizmu komórkowego odpowiedzialnego za korzystny efekt terapeutyczny zastosowanego schematu leczenia. Autorka opisuje w pracy kilka istotnie zmienionych parametrów w mikrośrodkowisku nowotworu oraz w miejscowej odpowiedzi immunologicznej, lecz który z nich i dlaczego, zdaniem Autorki, może najbardziej wpływać na uzyskane wyniki.

Ostatni podrozdział wyników poświęcony jest przedstawieniu danych z doświadczeń z zastosowaniem immunoterapii skojarzonej z podaniem cyklofosfamidu. Doktorantka wykazała, że zastosowanie tego cytostatyku zwiększa efekt terapeutyczny szczepionek na bazie transdukowanych komórek dendrytycznych, a w szczególności komórek dendrytycznych transdukowanych dwoma wektorami.

W rozdziale Dyskusja Doktorantka w sposób zwięzły i rzeczowy konfrontuje uzyskane wyniki z dostępną literaturą. Opisuje też jedyną zatwierdzoną klinicznie szczepionkę na bazie autologicznych komórek dendrytycznych. Chciałabym zapytać o inne trwające badania kliniczne szczepionek DC u pacjentów onkologicznych, jakich typów nowotworów dotyczą i w tym kontekście prosić o wyjaśnienie zastosowania do badań mysiego modelu raka jelita grubego.

Ponadto w Dyskusji Autorka podkreśla zalety wykorzystania w prezentowanych doświadczeniach terapeutycznych cyklofosfamidu, który wpływa m.in. na eliminację limfocytów T regulatorowych, a jednocześnie zwiększenie aktywności limfocytów T efektorowych CD4⁺ i CD8⁺. Wskazuje też modyfikacje schematu podawania opracowanych szczepionek, aby jeszcze zwiększyć skuteczność ich działania, a w szczególności podkreśla istotność odpowiednio dobranej chemioterapii. W tym kontekście chciałabym z kolei zapytać o możliwość połączenia opisanych w pracy komórek szczepionkowych z innymi formami immunoterapii np. z zastosowaniem inhibitorów immunologicznych punktów kontrolnych.

W ostatniej części rozprawy Doktoranta formułuje cztery wnioski, logicznie wynikające z analizy wyników uzyskanych w poszczególnych etapach badań.

Reasumując, w ogólnej ocenie merytorycznej stwierdzam, że postawione przez Doktorantkę cele zostały w pełni zrealizowane, a wnioski poparte są starannie zaplanowanymi i wykonanymi doświadczeniami. **Niewątpliwym atutem rozprawy doktorskiej mgr inż. Jagody Mierzejewskiej są wieloaspektowe doświadczenia *in vivo*, badające zarówno kinetykę**



odpowiedzi przeciwnowotworowej, jak i efekt terapeutyczny immunoterapii oraz chemioimmunoterapii. Zaprezentowane w rozprawie wyniki mają bardzo duże znaczenie nie tylko poznawcze, ale przede wszystkim aplikacyjne. Przedstawione dane mogą być pomocne w projektowaniu nowych badań klinicznych u pacjentów onkologicznych i tworzenia protokołów leczenia nowotworów w ramach terapii skojarzonej.

Na podstawie przeprowadzonej analizy rozprawy doktorskiej mgr inż. Jagody Mierzejewskiej stwierdzam, że rozprawa ta spełnia wymogi określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2018, poz. 1668 z późn. zm). Rozprawa doktorska stanowi oryginalne opracowanie, które w istotny sposób poszerza wiedzę na temat zastosowania komórek dendrytycznych transdukowanych lentiwirusowymi nośnikami genów IL-12 i IL-18 w immunoterapii przeciwnowotworowej oraz terapii skojarzonej z cyklofosfamidem. Uzyskane wyniki mogą znaleźć zastosowanie w opracowaniu bardziej skutecznych protokołów chemioimmunoterapii nowotworów litych. Treść rozprawy wskazuje na wysoki poziom wiedzy naukowej Doktorantki oraz świadczy o umiejętności samodzielnego prowadzenia badań naukowych. W związku z powyższym, wnioskuję o dopuszczenie mgr inż. Jagody Mierzejewskiej do dalszych etapów postępowania w przewodzie doktorskim oraz **wnioskuję o wyróżnienie pracy.**

dr hab. Kinga Majchrzak – Kuligowska