



UNIwersytet Medyczny

IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH WE WROCLAWIU

Dr hab. n med. Marek Ussowicz
Katedra i Klinika Transplantacji Szpiku,
Onkologii i Hematologii Dziecięcej
Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu

Wrocław, 27.07.2020

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr inż. Natalii Anger-Góry

Tytuł rozprawy: Wpływ redukcji stężenia interleukiny 10 w mikrośrodowisku nowotworowym na skuteczność terapii z udziałem cyklofosfamidu i komórek dendrytycznych stosowanej w modelu mysiego raka jelita grubego MC38

Promotor: dr hab. Joanna Rossowska

Zgodnie z uchwałą Rady Naukowej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej we Wrocławiu z dnia 27 kwietnia 2020 r. o powołaniu mnie na recenzenta rozprawy doktorskiej mgr inż. Natalii Anger-Góry, na temat „Wpływ redukcji stężenia interleukiny 10 w mikrośrodowisku nowotworowym na skuteczność terapii z udziałem cyklofosfamidu i komórek dendrytycznych stosowanej w modelu mysiego raka jelita grubego MC38”, mam zaszczyt przedstawić następującą opinię.

Immunoterapia jest uważana za jeden z kluczowych kierunków nowoczesnego leczenia nowotworów z przełomowymi odkryciami i niezwykłym postępem w praktyce klinicznej, których jesteśmy świadkami w ciągu ostatnich lat. Skomplikowane i często słabo poznane interakcje pomiędzy komórkami nowotworowymi i układem odpornościowym stoją na przeszkodzie w pełnym wykorzystaniu potencjału odpornościowego organizmu w skutecznym zwalczaniu nowotworów i wymagają opracowania modulacji mechanizmów ograniczających odpowiedź odpornościową.

Celem przedstawionej rozprawy było poznanie roli IL-10 i skutków zahamowania jej ekspresji w odpowiedzi odpornościowej w modelu mysiego raka jelita grubego. IL-10 była obiektem badań z uwagi na wielokierunkowy wpływ na układ



odpornościowy, w tym mechanizmy odpowiedzialne za skuteczność immunoterapii przeciwnowotworowej, jak hamowanie dojrzewania komórek dendrytycznych i obniżenie skuteczności prezentacji antygenów limfocytom T a z drugiej strony pobudzenie aktywacji komórek efektorowych i utrzymanie aktywności efektorowych cytotoksycznych limfocytów T (CTL).

Zawartość Rozprawy i Ocena Ogólna

Przedstawiona do recenzji praca liczy 162 strony i składa się z 6 rozdziałów. Podział rozprawy jest tradycyjny na Streszczenie w języku polskim i angielskim, Wstęp, Założenia i cel pracy, Materiał i metody, Wyniki, Dyskusję, Wnioski, Spis rycin i tabel, i Piśmiennictwo. Praca została napisana bardzo starannie i przejrzysto, a jej układ nie budzi zastrzeżeń. Ze strony edytorskiej na podkreślenie zasługują staranne i czytelne ryciny w liczbie 49 i tabele w liczbie 9 ilustrujące rozprawę.

Wstęp

Staranny i dogłębny, a zarazem przejrzysty wstęp o dużych walorach edukacyjnych, wprowadza w zagadnienie immunoterapii nowotworów. Wstęp spełnia zadanie podsumowania niezbędnej wiedzy i uzasadnia skomplikowaną metodologię zaplanowanych badań.

Cele

Cele pracy w liczbie 5, zostały starannie dobrane i przedstawione w jasny sposób.

Materiał i Metody

W rozdziale „Materiał i metody” Doktorantka scharakteryzowała grupę badawczą oraz zastosowane techniki laboratoryjne. Dla osiągnięcia celów pracy, Doktorantka zaplanowała i wykonała in vitro serię doświadczeń dotyczących skuteczności sekwencji shRNA w wyciszeniu ekspresji IL-10, określenia różnicowania i indukcji swoistej odpowiedzi odpornościowej komórek dendrytycznych i oceny aktywności komórek supresorowych pochodzenia mieloidalnego (MDSC) z wyciszoną ekspresją IL-10. W następnym etapie, Doktorantka przeprowadziła w modelu mysiego



raka jelita grubego MC38 badania aktywności komórek układu odpornościowego pod wpływem doguzowego podania wektorów lentiwirusowych, w tym wyciszających ekspresję IL-10 oraz ocenę przeciwnowotworowego efektu immunoterapii z udziałem komórek dendrytycznych i wektorów wyciszających IL-10 w części przypadków z zastosowaniem cyklofosfamid.

Metodyka została opisana w sposób dokładny i szczegółowy, dowodząc znajomości wykorzystanych technik badawczych. Na uwagę zasługuje zastosowana w pracy bardzo bogata i wielopoziomowa metodologia obejmująca badania za pomocą wielokolorowej cytometrii przepływowej oraz metodę ELISA z wykorzystaniem do badań komórek śledzionowych i tkanki guza, w tym komórek tworzących jego mikrośrodowisko, oraz eksperymentów na zwierzętach. Analiza statystyczna została przeprowadzona z użyciem prawidłowo dobranych metod statystycznych.

Wyniki

Wyniki badań zostały przedstawione w sposób uporządkowany i przejrzysty w postaci rozdziałów przedstawiających kolejne eksperymenty.

W pierwszym etapie, Doktorantka metodą eksperymentalną dobrała wektor lentiwirusowy (LV) z sekwencją sh najskuteczniej wyciszającą ekspresję IL-10.

W badaniach transdukowanych za pomocą LV komórek dendrytycznych, Doktorantka zaobserwowała, że wyciszenie ekspresji IL-10 przeciwdziało powstawaniu tolerogennych komórek dendrytycznych i promowało fenotyp BMDC indukujący zwiększoną aktywność cytotoksyczną splenocytów wobec komórek MC38. Wyciszenie ekspresji IL-10 powodowało przeciwstawne zmiany w aktywności monocytarnych (M-MDSC) i granulocytarnych (PMN-MDSC) komórek supresorowych pochodzenia mieloidalnego w postaci odpowiednio zwiększenia lub zmniejszenia aktywności supresorowej wobec limfocytów T.

W badaniach wpływu wektorów LV shIL-10 na aktywność komórek układu odpornościowego, Doktorantka zaproponowała 2 schematy podawania LV, 6 i 10 dniowy, aby ocenić wpływ podania wektorów na różnych etapach kształtowania odpowiedzi odpornościowej indukowanej pierwszą iniekcją. Porównanie dwóch schematów podawania wektora lentiwirusowego w oparciu o analizę poziomu ekspresji EGFP w mikrośrodowisku nowotworu oraz stężenia IL-10 w nadsącach



znad hodowli komórek guzów potwierdziły zasadność stosowania wektorów wyciszających IL-10 w odstępach tygodniowych. Redukcja stężenia IL-10 nasiliła supresję związaną z aktywnością komórek mieloidalnych znajdujących się w mikrośrodowisku nowotworu ale efekt ten był krótkotrwały i dziesiątego dnia po rozpoczęciu podawania wektorów LV shIL-10 komórki mieloidalne izolowane z guzów nie hamowały proliferacji limfocytów T. Interesującą obserwacją, poczynioną przez Doktorantkę, było odnotowanie nacieku limfocytów T CD8⁺ w guzach traktowanych wektorami LV shIL-10 dopiero dziesiątego dnia po rozpoczęciu podawania wektorów, co zostało wytłumaczone opóźnieniem odpowiedzi odpornościowej wskutek obniżonego stopnia dojrzałości komórek dendrytycznych i słabszej prezentacji antygenów w guzach traktowanych wektorami LV shIL-10.

Doktorantka zaobserwowała efekt podaży wektorów LV na aktywność komórek układu odpornościowego, co zinterpretowała przez istnienie odpowiedzi swoistej wobec antygenów wirusowych i mechanizmów wrodzonych angażujących np. układ TLR, ale również prawidłowo dostrzegła, że wystąpienie wcześniej się ujawniającej odpowiedzi wobec LV utrudnia możliwość oceny efektu obniżenia ekspresji IL-10.

Doktorantka zaobserwowała podwyższoną aktywność limfocytów w wartowniczych węzłach chłonnych niezależnie od rodzaju zastosowanych wektorów, co może być następstwem wywoływanej przez LV ogólnoustrojowej odpowiedzi odpornościowej, przy czym za podwyższoną aktywność cytotoksyczną odpowiadały zgodnie z oczekiwaniami przede wszystkim komórki NK ale również zaobserwowano CD4⁺ CTL. Po zastosowaniu wektorów lentiwirusowych nie została pobudzona swoista wobec komórek MC38 odpowiedź zależna od CD8⁺CTL. W guzach, gdzie stężenie IL-10 było zredukowane, odnotowano nie tylko mniej limfocytów T CD8⁺, ale także odsetek komórek efektorowych wśród nich był niższy, niż po zastosowaniu wektorów kontrolnych, co znajduje poparcie w wiedzy, że IL-10 jest niezbędna do utrzymania aktywności CTL.

Interesującym aspektem badań była próba wzmocnienia efektu immunoterapeutycznego przez zastosowanie cyklofosfamidu, który w niskich dawkach, powoduje selektywną eliminację limfocytów T regulatorowych, a także indukując immunogenną śmierć komórek nowotworowych przyczynia się do zwiększenia aktywności efektorowych limfocytów T oraz wspomaga powstawanie



pamięci immunologicznej. Analizy przeprowadzone ósmego i dwunastego dnia po podaniu cyklofosfamidu nie wykazały obniżenia odsetka limfocytów Treg wśród limfocytów T CD4+ zidentyfikowanych w guzach, co zostało zinterpretowane jako następstwo regeneracji Treg. Komórki pochodzące z guzów myszy otrzymujących cytostatyki wykazywały zwiększony poziom ekspresji cząsteczek MHC II oraz CD86 w porównaniu do kontroli nietraktowanej. Efekt ten został zinterpretowany jako związany z gromadzeniem w mikrośrodku nowotworu cząsteczek DAMP, uwalnianych przez komórki nowotworowe pod wpływem cyklofosfamidu i w efekcie zwiększony napływ komórek dendrytycznych, które po dotarciu do guza pochłaniają uwolnione antygeny nowotworowe, a następnie migrują do wartowniczych węzłów chłonnych, gdzie prezentują je dziewiczym limfocytom T. Oryginalną obserwacją było stwierdzenie braku efektu podania cyklofosfamidu dla nasilenia opisywanej w literaturze aktywności supresyjnej MDSC. Analiza populacji komórek mieloidalnych wykazała, że zastosowanie wektorów LV shIL-10 skutkowało obniżeniem odsetka makrofagów związanych z nowotworem (TAM) wśród leukocytów naciekających guzy, co obserwowano również w doświadczeniach przeprowadzonych według krótkich schematów podań wektorów LV. Wśród TAM znajdujących się w środowisku nowotworowym dominują makrofagi o polaryzacji M2, które obniżają aktywność komórek NK oraz efektorowych limfocytów Th i CTL, promują rekrutację MDSC i limfocytów Treg, a także hamują zdolność komórek dendrytycznych do wydzielania IL-12.

Zastosowanie w protokole immunoterapii wektorów LV shIL-10 przyczyniło się do zwiększenia skuteczności szczepionek BMDC/TA_g w indukcji miejscowej i ogólnoustrojowej odpowiedzi przeciwnowotworowej zależnej od aktywności T CD4+, T CD8+ i komórek NK ale bez zmian w obrębie populacji komórek supresorowych, takich jak M-MDSC, limfocyty Treg i makrofagi typu M2. Dopiero rozszerzenie protokołu immunoterapii o jednokrotne podanie immunomodulującej dawki cyklofosfamidu, wpłynęło na znaczną redukcję M-MDSC i limfocytów Treg oraz polaryzację makrofagów w kierunku komórek typu M1. Zmiany zachodzące w mikrośrodku nowotworu pod wpływem chemioimmunoterapii z udziałem CY, BMDC/TA_g i wektorów LV shIL-10 umożliwiły pobudzenie ogólnoustrojowej



odpowiedzi typu Th1, co dodatkowo potwierdzono oceniając poziom ekspresji czynników transkrypcyjnych T-bet i FoxP3 w śledzionowych limfocytach T.

Najsilniejszy efekt hamujący limfocyty Treg i najwyższe odsetki limfocytów T, NK i NKT Doktorantka zaobserwowała po zastosowaniu chemioimmunoterapii z udziałem CY, BMDC/TAg i wektorów LV shIL-10, co jest w mojej opinii ważną przesłanką z przedstawionych badań, z potencjalnymi następstwami praktycznymi.

Dyskusja

Dyskusja ma obiektywny i zdystansowany charakter w stosunku do uzyskanych przez Autorkę wyników i odnosi je do wyników przedstawionych przez innych badaczy. Doktorantka wykazuje się zdolnością kojarzenia faktów i dobrą znajomością piśmiennictwa w postaci 187 odnośników literaturowych. Walorem piśmiennictwa jest trafny dobór wyczerpujący stan aktualnej wiedzy i jego nowoczesność.

Wnioski

Wnioski przedstawione w formie jednolitego akapitu wynikają z przeprowadzonych badań i odnoszą się do pytań postawionych w celach pracy. Doktorantka udowodniła, że redukcja stężenia IL-10 w mikrośrodowisku nowotworu przy jednoczesnej immunomodulacji za pomocą cyklofosfamidu przyczynia się do zwiększenia skuteczności szczepionkowych komórek dendrytycznych w indukcji swoistej odpowiedzi przeciwnowotworowej. Eksperymentalny wybór shRNA (shIL-10-3) również powinien być ujęty we wnioskach w odniesieniu do celu nr 1, ponieważ jest dowodem na zróżnicowaną skuteczność cząsteczek RNA w wyciszeniu ekspresji IL-10.

Uwagi krytyczne

Poniżej przedstawiam niewielkie uwagi krytyczne, które nasunęły mi się podczas lektury rozprawy.

1. W eksperymentach wykorzystywano myszy szczepu C57BL/6, ale nie podano informacji o liczebności zwierząt eksperymentalnych w grupach badanych. Z ryciny 42 prawdopodobnie wynika, że badano 4 grupy po 6 myszy. W



przypadkach doświadczeń wymagających randomizacji myszy nie opisano sposobu jej przeprowadzenia.

2. Mean fluorescence intensity (MFI) jest parametrem podatnym na warunki przygotowania i wczytywania próbki do analizy cytofluorymetrycznej, przez co ocena ekspresji białka na podstawie intensywności fluorescencji związanego przeciwciała może wносить niedokładności. Ograniczeniem MFI w analizie porównawczej jest konieczność rozkładu normalnego fluorescencji, który w pojedynczych analizach ekspresji MHC II (ryciny na stronach 75 i 77) nie wystąpił, bo ekspresja MHC II na komórkach dendrytycznych CD11c+ (Ryc. 13 A/B) miała rozkład bimodalny, a z kolei na rycinie 14 C zaprezentowano porównanie MFI dla MHC II.

Uwagi redakcyjne

Praca napisana jest bardzo starannie, poprawnym językiem bez istotnych błędów stylistycznych i interpunkcyjnych. Dla dochowania staranności obowiązków recenzenta, pragnę zwrócić uwagę na niezręczności w sformułowaniach :

„1.2.1. Właściwości immunosupresorowe” – powinno być immunosupresyjne (za Słownikiem Języka Polskiego)

Str. 21 zamiast „złymi prognozami” – powinno być „złym rokowaniem”

Str. 27 zamiast „w kontekście” – powinno być poprzez/za pomocą

Str. 54 „zdjęto z butelek” można zastąpić przez np. „zebrano z hodowli”; „zdjęto z dołków” – zebrano z dołków

Str. 72 „kokulturę” można zastąpić przez „wspólną hodowlę”.

W pracy występują pojedyncze błędy interpunkcyjne (np. str. 16 „Natomiast,”).

W pracy występują drobne usterki redakcyjne. Wykaz skrótów nie jest w kolejności alfabetycznej (np. litera T). Numer rozdziału na stronie 94 powinien być (4.4.1.3.), jak w spisie treści.

Str. 35 – zamiast „retrovidae” powinno być „retroviridae”

Str. 36 – skrót DIS powinien być rozwinięty jako „dimerization initiation signal, DIS” a PPT jako “polypurine tract”

Str. 51 – zamiast “zawrócono” powinno być „zwrócono”



Str. 52 – zamiast „Mecherey” powinno być „Macherey”, zamiast „ReverAid” powinno być „RevertAid”

Str. 53 „Hprt” powinno być zapisane jako „HPRT1”.

PODSUMOWANIE

W podsumowaniu podkreślę, że Doktorantka wykazała się umiejętnością właściwego sformułowania i starannego rozwiązania problemu badawczego, uzyskała nowatorskie i wartościowe wyniki o znaczeniu praktycznym, przedstawiła znajomość aktualnego stanu wiedzy w temacie badań, i osiągnęła cele dając dowód samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Do istotnych i oryginalnych elementów rozprawy zaliczam zastosowanie nowoczesnych i skomplikowanych metod badawczych, doskonałą znajomość technik świadcząca o samodzielnym wykonaniu badań oraz praktyczne znaczenie uzyskanych wyników. Przedstawione w niniejszej recenzji uwagi mają charakter marginalny, nie wpływają na moją bardzo wysoką ogólną ocenę przedstawionej rozprawy.

Stwierdzam, że praca p.t. „Wpływ redukcji stężenia interleukiny 10 w mikrośrodowisku nowotworowym na skuteczność terapii z udziałem cyklofosfamidu i komórek dendrytycznych stosowanej w modelu mysiego raka jelita grubego MC38” jest oryginalnym rozwiązaniem problemu naukowego oraz wartościowym dokonaniem Autorki i spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim przez obowiązującą w Polsce ustawę „Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce”. Mam zaszczyt i przyjemność przedstawić wniosek o dopuszczenie pracy do publicznej obrony. Jednocześnie, biorąc pod uwagę wysoki poziom recenzowanej rozprawy oraz dorobek naukowy Autorki, wnioskuję o wyróżnienie rozprawy doktorskiej.


Dr hab. n. med. Marek Ussowicz
Specjalista pediatrii, transplantologii
klinicznej, onkologii
i hematologii dziecięcej
5458206