

prof. zw. dr hab. n. wet. Tadeusz Stefaniak

Wrocław 16.05.2020

Katedra Immunologii, Patofizjologii i Prewencji Weterynaryjnej

Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr inż. Marty Lisowskiej

pt.: „**Wytworzenie i charakterystyka nowych przeciwciał monoklonalnych swoistych wobec antygenów zgodności tkankowej DR psa (DLA-DR) jako narzędzi w diagnostyce i eksperymentalnej terapii chłoniaków**”

wykonanej pod kierunkiem prof. dr hab. Arkadiusza Miążka w Zakładzie Immunologii Nowotworów Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda PAN we Wrocławiu.

Badania zostały wykonane dzięki finansowaniu dwóch projektów ze środków MNiSW: PRELUDIUM- gdzie Doktorantka była kierowniczką projektu i TANGO (kier. dr hab. Andrzej Rapak).

Tematyka rozprawy jest poświęcona diagnostyce i próbie wdrożenia terapii doświadczalnej chłoniaków, jednych z najtrudniejszych w diagnostyce i terapii nowotworów psa.

Na początku rozprawy Autorka zamieściła wykaz skrótów. Jest to pomysł dobry, ponieważ wykorzystane wielu technik, rodzajów podłoży, linii komórek doświadczalnych określanych potocznie skrótami używanymi w środowiskach doświadczalnych pozwala na uporządkowanie nazewnictwa i powinno ułatwić czytającemu uniknięcie wątpliwości. Zaskoczył mnie jednak brak wyjaśnienia dla wielu innych skrótów używanych w tekście. Poza tym niektóre skróty, które pojawiły się w tekście nie posiadają rozwinięcia (np. linie CLBL1, CCLB70, technologia CAR T, i inne) pogarsza to komfort czytającego rozprawę.

W liczącym 15 stron wstępie, w ciekawy sposób opisane zostały problemy występowania chłoniaków w populacji ludzi i psów, zwrócono uwagę na możliwość użycia chłoniaków u psów w badaniach modelowych. Szkoda, że na rysunku 2 nie wyjaśniono znaczenia poszczególnych skrótów na wykresach (np. LBT, PTCL), też pozawęzłowy chłoniak strefy brzeżnej został w skrócie nazwany MALT, ten skrót od wielu lat powszechnie jest używany dla opisu tkanki limfoidalnej towarzyszącej błonom śluzowym. Chyba szczęśliwiej byłoby go nazwać MALT-L (od lymphoma). Zwrócono uwagę na możliwość wykorzystania humanizowanych przeciwciał monoklonalnych w leczeniu chłoniaków, opisano możliwości znakowania przeciwciał skierowanych przeciw wybranym antygenom z

cytostatykami, co pozwala na obniżenie dawki leku dzięki celowanemu dostarczeniu w okolicę nowotworu, a dzięki temu ograniczenie efektów ubocznych wynikających ze stosowania cytostatyków. Doktorantka zwróciła uwagę, że terapia chłoniaków u psów jest dzisiaj mało skuteczna, m.in. z powodu niemożności stosowania tak wysokich dawek cytostatyków, jakie są stosowane u ludzi. Bardziej dokładnie omówiła zastosowanie u psów metotreksatu, który został wykorzystany dalej do koniugacji z doświadczalnym przeciwciałem.

Bardzo ciekawy wykres opisujący występowanie chłoniaków u ludzi posiada niekompletną legendę, wskutek czego niektóre skróty pozostają nieznane. Z dużym zainteresowaniem przyjrzałem się tabeli 1, która deklaruje opis przeciwciał stosowanych w terapii chłoniaków, ale choćby w konfrontacji z tekstem robi wrażenie obarczonej licznymi brakami, co ogranicza przydatność takiego zestawienia. Należałoby ją uzupełnić także o przykłady koniugatów przeciwciał z cytostatykami, o których wspomina w tekście.

Autorka omówiła także potencjalne możliwości oznaczania rozpuszczalnych form antygenów MHC klasy II, których stężenie znacząco wzrasta w przebiegu chłoniaków. Zwróciła też uwagę na silną ekspresję tej klasy antygenów na komórkach chłoniaka. Na przykładzie humanizowanego przeciwciała monoklonalnego L243 i jego koniugatów z lekami cytostatycznymi potwierdzono wysoką efektywność terapii niektórych typów chłoniaków u ludzi z wykorzystaniem przeciwciał reagujących z antygenami MHC klasy II.

Celem rozprawy było samodzielne wyprodukowanie przeciwciał monoklonalnych rozpoznających antygeny powierzchniowe występujące na komórkach psich chłoniaków B-komórkowych i potwierdzenie ich udziału w wybranych rodzajach cytotoxycności. Ten cel został uszczegółowiony w ośmiu punktach odpowiadających późniejszym badaniom, w tym ocena aktywności przeciwnowotworowej koniugatu przeciwciał z wybranym cytostatykiem na modelu mysim *in vivo*.

Dość obszerny (liczący 17 stron) rozdział materiał i metody w skróty opisuje odczynniki, bufory, pożywki, immunoreagenty, a także startery i wektory użyte w do tworzenia konstrukcji genowych, w tym kaninizowanego przeciwciała wymieniono w układzie tabelarycznym. W tabeli opisującej odczynniki (rozdział 3.1.1.) brakuje wzmianki o przeciwciałach użytych w teście ELISA. Wielość i interdyscyplinarny zakres metod użytych w badaniach wzbudza respekt, np. samodzielne wyprodukowanie i wyselekcjonowanie hybridoma produkujących dwa używane dalej przeciwciała rozpoznające konformacyjne epitopy na antygenach DLA-DR psa, czy uzyskanie komórek linii CLBL1 z genem lucyferazy świetlika i zakończone sukcesem wykorzystanie ich w eksperymencie *in vivo* na myszach

NOD/SCID w ocenie porównawczej efektu leczniczego przeciwciał B5, metotreksatu i koniugatu przeciwciał B5 z metotreksatem.

Uzasadnieniem dla proponowania jako celu dla wytwarzanych przeciwciał antygenów zgodności tkankowej klasy II (DLA-DR) jest zdaniem Autorki fakt, że w trakcie leczenia w komórkach nowotworowych często narasta oporność na przeciwciała anty-CD20, często stosowane u ludzi, a także ze względu na występowanie chłoniaków pozbawionych CD20. Atutem dla wybranej koncepcji jest wysoka gęstość ekspresji MHC klasy II na większości chłoniaków B-komórkowych. Co ważne, przeciwciała anty HLA DR wykazywały się znacznie wyższą cytotoksycznością dla komórek chłoniaków B-komórkowych, niż przeciwciała przeciw szeregowi innych antygenów różnicowania. Ze względów diagnostycznych interesujące może też okazać się oznaczanie rozpuszczalnych cząsteczek MHC klasy II, złuszczonych w zwiększonej lub obniżonej ilości na egzosomach co u ludzi jest charakterystyczne dla niektórych typów komórek nowotworowych.

Test ELISA do wykrywania antygenów DLA-DR konstruowano przy użyciu przeciwciał B5 opłaszczanych na mikropłytkach, a jako drugie przeciwciało zastosowano biotynylowane przeciwciało E11. Do wywołania reakcji barwnej użyto streptawidyny związanej z peroksydazą z chrzanu, a jako substratu TMB. W opisie metodyki testu ELISA brakuje opisu etapu dodawania antygeny, czyli sposobu sporządzania lizatów badanych komórek linii doświadczalnych i komórek z bioptatów uzyskanych od pacjentów, a także sposobu użycia surowic pacjentów w celu wykrywania rozpuszczalnych antygenów DLA-DR.

Przeciwciała kontrolne używane w badaniach cytotoksyczności i fagocytozy powinny zostać scharakteryzowane w rozdziale materiał i metody choćby w zakresie reaktywności z podjednostkami alfa i beta oraz pełnymi cząsteczkami DLA-DR.

Kluczowym osiągnięciem Doktorantki było uzyskanie dwóch przeciwciał monoklonalnych (B5 i E11), wykrywających epitopy konformacyjne na cząsteczkach DLA-DR, ale nie na DLA-DQ. Używając stosownych metod potwierdzono, że epitop dla przeciwciała B5 znajduje się na łańcuchu DR α . Z kolei przeciwciało E11 do związania z epitopem wymaga obecności obydwu łańcuchów DLA-DR. Dzięki takiej swoistości oba przeciwciała wykrywały komórki dwóch typowych linii B-komórkowych CLBL1 i CLB70, T-komórkowej linii CL-1, ale nie reagowały z komórkami linii NK (CH89), prawidłowych komórek krwi, czy linii GL-1 nie wykazującej ekspresji antygenów MHC klasy II. Szkoda, że nie sprawdzono, czy usunięcie łańcuchów cukrowych wpłynęłoby na powinowactwo przeciwciał do antygenów DLA-DR.

Przy użyciu stosownie dobranych metod Doktorantka przeprowadziła wielokierunkowe badania stosownie do sformułowanych celów pracy. Autorka wykazała, że

dodatek przeciwciał B5 i E11 w 48 godzinnej hodowli komórek CLBL1 i CLB70 powodował ograniczenie odsetka komórek żywych o 20-41%, w porównaniu do przeciwciał kontrolnych.

Przeciwciała B5 i E11 wykazały *in vitro* umiarkowaną, zależną od dawki cytotoksyczność bezpośrednią wobec linii chłoniaka psiego CLBL1.

Doktorantka potwierdziła, że oba przeciwciała w stężeniu 5µg/ml przy dodaniu dopełniacza powodują śmiertelność komórek CLBL1 i CLB70 na poziomie 70-80% (gdy dodatek przeciwciał kontrolnych powodował śmierć poniżej 20% komórek niezależnie od ich stężenia). Potwierdza to zdolność badanych przeciwciał do indukowania cytotoksyczności zależnej od dopełniacza. W interpretacji rys.18 Autorka popełniła błąd mówiąc, że silniejszy efekt odniosły przeciwciała B5, bo zarówno wobec komórek CLBL1, jak i CLB70 wyższa śmiertelność wystąpiła przy użyciu przeciwciał E11. Ze względu na możliwą w przyszłości aplikację terapeutyczną ważnym odkryciem jest to, że w obecności badanych przeciwciał i dopełniacza nie dochodzi do śmiertelności prawidłowych komórek jednojądrzastych krwi krążącej.

Na linii makrofagów mysich (RAW264) wykazano także, że dodatek badanych przeciwciał zwiększa fagocytozę obu badanych linii komórek chłoniaka. Brakuje jednak wyjaśnienia w legendzie rys.20 co oznaczają gwiazdki w porównaniu przeciwciał kontrolnych z obu badanymi, zakładam, że chodzi o statystyczną istotność różnic.

Wykazała także, że przeciwciała B5 powodują w 48 godzinnej hodowli apoptozę 62% komórek CLBL1 i 41% komórek CLB70, potwierdziła przy tym obecność aneksyny V i aktywność kaspaz 3/7, a zastosowanie inhibitora kaspaz (ZVAD) hamowało śmiertelność komórek. W przypadku przeciwciał E11 ten efekt był znacznie słabszy. W sposób moim zdaniem nieuprawniony Autorka traktuje proces apoptozy (programowanej śmierci komórki) jako efekt cytotoksyczny.

Kolejnym aspektem rozprawy była ocena przydatności wyprodukowanych przeciwciał w diagnostyce chłoniaków u psów przy użyciu testu ELISA. Wykorzystano przy tym różnicę w epitopach rozpoznawanych przez przeciwciała B5 (opłaszczane na płytce) i E11 (jako drugie, biotynylowane przeciwciało, badając lizaty komórek uzyskanych przez biopsję cienkoigłową z chłoniaków u psów (B, T lub B/T komórkowych). Wykazano, znacznie silniejszą reakcję lizatów komórek pobranych od pacjentów z chłoniakami w porównaniu do komórek od pacjentów poddanych eutanazji z innych powodów (różnica istotna statystycznie, Autorka nie podała, czy były to biopaty z innych rodzajów nowotworów). Warto podkreślić, że w tym szerokim wachlarzu badań Doktorantka stosowała dobrane, nowoczesne metody diagnostyczne, starała się potwierdzać poprawność wniosków wykorzystując wyniki uzyskane przy użyciu różnych metod.

W dyskusji Autorka przeprowadziła ocenę własnych wyników w konfrontacji z wynikami głównie pochodzącymi z medycyny ludzkiej i nielicznymi wynikami uzyskanymi przez inne zespoły badawcze u psów. Bardzo interesujący jest rozdział omawiający różne przeciwciała znane z medycyny ludzkiej, a także dyskusja nt. cytostatyków użytych w koniugatach przeciwciał stosowanych w medycynie ludzkiej. Odnoszę wrażenie, że wybór metotreksatu był dobrze przemyślany i trafiony. Ustalenie dawki przeciwciał lub koniugatów przeciwciał która pozwoli na remisję nowotworu u psów wymagać będzie pewnie długotrwałych badań klinicznych.

Podsumowując, można stwierdzić, że szczegółowe cele rozprawy zostały osiągnięte: uzyskano dwa przeciwciała monoklonalne rozpoznające konformacyjne epitopy na antygenach DLA-DR, zidentyfikowano lokalizację tych epitopów na cząsteczce MHC klasy II. Potwierdzono powinowactwo uzyskanych przeciwciał do ustalonych linii komórkowych i komórek spontanicznych chłoniaków psa, na których stwierdzono silną ekspresję rozpoznawanych antygenów, co potwierdza przydatność uzyskanych przeciwciał w diagnostyce chłoniaków u psa. Wykazano cytotoksyczność bezpośrednią, zależną od dopełniacza a także zdolność do indukowania procesu apoptozy w komórkach chłoniaka, w stosownie dobranych doświadczeniach wykazano szereg mechanizmów oddziaływania wyselekcjonowanych przeciwciał wobec linii komórek chłoniaka CLBL1 i CLB70. Potwierdzono, że indukują one proces apoptozy z aktywacją kaspaz. Przy użyciu przeciwciał B5 wykazano, że dodatek inhibitora kaspaz (ZVAD) ogranicza śmiertelność komórek. Opracowano testy ELISA umożliwiające wykrywanie antygenów DLA-DR w lizatach komórek –pochodzących z bioptatów, ale także do oznaczania rozpuszczalnych antygenów DLA-DR w surowicy psów z chłoniakiem, a wyniki wskazują na potencjalną przydatność opracowanych testów w monitorowaniu leczenia. Uzyskano kaninizowane przeciwciała B5, które wykorzystano najpierw w doświadczeniach *in vitro*, następnie *in vivo* na modelu myszy NOD-SCID obarczonych komórkami linii CLBL1-LUC, w którym zarówno same przeciwciała, ale w silniejszym stopniu po koniugacji z metotreksatem wykazywały istotny statystycznie obniżenie liczby podanych komórek w szpiku, ale także istotnie statystycznie obniżenie stężenia rozpuszczalnych antygenów DLA-DR w surowicy badanych myszy. To potwierdza potencjalną przydatność uzyskanych przeciwciał i ich koniugatów z metotreksatem w leczeniu chłoniaków u psów. Daje to nadzieję na przełom w metodach walki z chłoniakami psów.

Autorka wykazała się umiejętnością dobrania nowoczesnego warsztatu badawczego, pozwalającego na wielostronną i bogatą analizę i weryfikację tez badawczych. Na podstawie uzyskanych wyników doszła do ciekawych wniosków, które umiejętnie uzasadniła. Uzyskane wyniki zostały w części przyjęte do druku w renomowanych, recenzowanych czasopismach o

zasięgu międzynarodowym, co potwierdza ich wysoką wartość poznawczą. Stanowią ważny przyczynek w doskonaleniu metod wczesnej diagnostyki i leczenia chłoniaków u psów, gatunku zwierząt, u którego dotychczasowe efekty zapobiegania i leczenia tego nowotworu są bardzo ograniczone. Poprawiona wersja rozprawy poza pojedynczymi „literówkami” nie zawiera już wcześniejszych błędów.

W związku z powyższym, powołując się na art.179 ust 1. ustawy Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2018 poz. 1669) stwierdzam, że przedłożona rozprawa doktorska spełnia wymogi określone artykułem 13 ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki.

Jednocześnie, doceniając ogrom pracy włożonej w prezentowaną rozprawę, uwieńczoną spektakularnymi wynikami mającymi potencjalną wartość aplikacyjną w leczeniu chłoniaków psów, wnioskuję o nagrodzenie mgr inż. Marty Lisowskiej stosowną nagrodą.


Prof. dr hab. inż. STEFANIŁ
LEKARZ WETERYNARI
ul. gen. Abrahama 41
52- 211 Wrocław