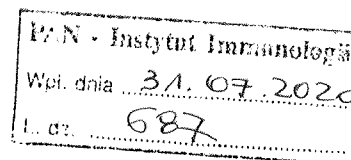


dr hab. n.med. Jarosław Baran, Prof. UJ
Zakład Immunologii Klinicznej,
Katedra Immunologii Klinicznej i Transplantologii,
Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum,
ul. Wielicka 265, 30-663 Kraków



RECENZJA

Rozprawy doktorskiej mgr inż. Natalii Anger-Góry

pt. „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”

Praca została wykonana pod kierunkiem dr hab. Joanny Rossowskiej
w Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda,
Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu.

Immunoterapia nowotworów jest obecnie bardzo obiecującą i dynamicznie rozwijającą się dziedziną medycyny. Wprowadzenie do kliniki przeciwciał monoklonalnych w różny sposób ograniczających rozwój nowotworu i/lub wspierających własny układ odpornościowy pacjenta (np. inhibitory punktów kontroli immunologicznej) oraz terapii komórkowych, wspomagających standardowe metody leczenia, zrewolucjonizowało współczesną onkologię. Na tym polu coraz większe nadzieje wiąże się z wykorzystaniem własnych komórek układu odpornościowego pacjenta (komórki dendrytyczne, swoiste dla antygenów nowotworowych limfocyty T CD8+), które po izolacji i odpowiednim przygotowaniu w warunkach *in vitro* (np. namnożenie, aktywacja, modyfikacje genetyczne), stanowią coraz bardziej skuteczny element terapii przeciwnowotworowej.

W przedstawionej do recenzji rozprawie doktorskiej, mgr inż. Natalia Anger-Góra podjęła się zbadania wpływu obniżenia lokalnej produkcji IL-10 w mikrośrodowisku guza na efektywność eksperymentalnej chemioimmunoterapii mysiego raka jelita grubego MC38 z użyciem cyklofosfamidu i komórek dendrytycznych stymulowanych *in vitro* antygenami linii MC38. Podjęcie takiej tematyki badawczej było jak najbardziej uzasadnione, gdyż jednym z powodów obserwowanej ograniczonej skuteczności terapeutycznej komórek dendrytycznych (np. preparatu Sipuleucel-T) jest obecność w środowisku nowotworu czynników immunosupresyjnych, uniemożliwiających skuteczną aktywację mechanizmów odpowiedzi przeciwnowotworowej. Poznanie sposobów pozwalających na zwiększenie efektywności takich form terapii jest więc wciąż wyzwaniem dla współczesnej nauki.

Rozprawa liczy 162 strony druku i posiada układ typowy dla prac doświadczalnych. Pod względem redakcyjnym nie budzi zastrzeżeń, a proporcje pomiędzy poszczególnymi działami są odpowiednio zachowane. Uwagę zwraca bardzo wysoka jakość strony edytorskiej monografii.

Obszerny wstęp wprowadza czytelnika w problematykę podjętych badań, poczynając od opisu roli układu odpornościowego w powstawaniu nowotworów, z uwzględnieniem wszystkich faz tego procesu, aż do ucieczki komórek nowotworowych spod nadzoru

immunologicznego. W kolejnych podrozdziałach Autorka przedstawia rolę mikrośrodowiska guza w progresji nowotworu, ze szczególnym uwzględnieniem komórek o charakterze immunoregulacyjnym – limfocytów T regulatorowych (Treg), mieloidalnych komórek supresorowych (MDSC) i makrofagów związanych z nowotworem (TAM). Szczegółowo omawia rolę interleukiny 10 w regulacji aktywności komórek odpornościowych, drobiazgowo przedstawia możliwości ograniczenia jej lokalnej produkcji w obrębie guza za pomocą interferencji RNA, by dalej płynnie przejść do opisu strategii wykorzystywanych w immunoterapii komórkowej nowotworów, koncentrując się na użyciu komórek dendrytycznych. Wstęp kończy podrozdział poświęcony immunomodulacyjnym właściwościom cyklofosfamidu. Cały ten rozdział posiada ogólnie edukacyjny charakter, dodatkowo poparty drobiazgowo opracowanymi kolorowymi rycinami, podsumowującymi informacje zawarte w kolejnych podrozdziałach.

Napisanie całej tej części rozprawy wymagało od Doktorantki dużo wysiłku, gdyż dotyczyło różnorodnych zagadnień, których złożenie w logiczną całość nie było łatwe. Doktorantka wywiązała się z tego zadania bardzo dobrze, choć w tej części zabrakło mi konkretnego odniesienia do raka jelita grubego, którego dotyczy przedstawiona rozprawa. W opinii recenzenta Doktorantka powinna poświęcić nieco uwagi wyjaśnieniu, dlaczego swoje badania realizowała właśnie na modelu tego nowotworu. Również rola makrofagów typu M2 powinna zostać szerzej opisana w kontekście rozwoju raka jelita grubego, gdyż doniesienia na ten temat nie są jednoznaczne, a niektóre badania wskazują wręcz, że ich obecność w nacieku okołoguzowym koreluje z dobrym rokowaniem dla pacjentów. W odniesieniu do samej terapii nowotworów z wykorzystaniem komórek DC zadziwia mnie tu brak powołania się Doktorantki na badania profesor Karoliny Pałuckiej, naszej rodaczki od lat pracującej w USA, której wkład w rozwój tej formy immunoterapii jest trudny do przecenienia.

Założenia i cel pracy zostały jasno sformułowane, a podjęte w nim zadania były bardzo ambitne. Doktorantka podjęła się w nich bowiem przeanalizowania całej gamy parametrów, poczynając od oceny skuteczności wybranych sekwencji shRNA w wyciszeniu ekspresji IL-10 w kom. dendrytycznych (BMDC) i MDSC różnicowanych *in vitro* ze szpiku kostnego myszy oraz wpływu takiego wyciszenia na ich funkcje, po analizę *ex vivo* składu komórkowego nacieku guza i ocenę ogólnoustrojowej odpowiedzi przeciwnowotworowej w sytuacji ograniczenia lokalnej (w obrębie guza) produkcji IL-10. Analizy te Doktorantka zaplanowała wykonać w dwóch, różnych co do czasu trwania, protokołach terapeutycznych, zarówno po włączeniu immunoterapii z komórek dendrytycznych stosowanej indywidualnie, jak i w schemacie uzupełnionym o cyklofosfamid. W przebiegu tak zaplanowanej terapii nie zabrakło również monitorowania *in vivo* wielkości podskórnie rozwijających się guzów. Dla pełnego zrozumienia strategii badawczej istotne byłoby wszakże wyjaśnienie dlaczego do redukcji poziomu IL-10 w mikrośrodowisku guza Doktorantka zdecydowała się zastosować skomplikowaną i nie w pełni skuteczną procedurę interferencji RNA, a nie skorzystała ze znacznie prostszych rozwiązań, jak np. neutralizacji IL-10 za pośrednictwem przeciwciał monoklonalnych podawanych doustowo.

Kolejna część pracy to „Materiały i metody”. Przedstawione w nim procedury laboratoryjne są właściwie dobrane, a ich opis szczegółowy. Uwagę zwraca szeroki zakres zastosowanych metod badawczych, uwzględniający również techniki biologii molekularnej i bardzo zaawansowaną wielokolorową analizę cytofluorymetryczną, obejmującą zarówno badania fenotypowe, jak i funkcjonalne komórek. W tym kontekście warto podkreślić, iż analiza cytofluorymetryczna składu komórek mieloidalnych w nacieku guza czy węzłach chłonnych myszy należy do trudnych i niestandardowych badań, zwłaszcza w tak szerokim

ujęciu. Takie podejście metodyczne świadczy o dobrym opanowaniu tej techniki i swobodnym jej wykorzystywaniu przez Doktorantkę. Moja uwaga do tego fragmentu dotyczy użytych tu układów kontrolnych, konkretnie kontroli negatywnych, w oparciu o które w analizie wyników odcina się poziom fluorescencji tła. Doktorantka pisze (str.54), iż do każdej próbki sporządzono kontrolę izotypową. Nie jest to jednak rozwiązanie optymalne, gdyż do tak złożonych wielokolorowych analiz bardziej adekwatne byłoby użycie kontroli FMO (Fluorescence number Minus One). Tylko taka kontrola bowiem umożliwia właściwe odcięcie tła, z uwzględnieniem „zachodzenia na siebie” różnych kolorów fluorescencji (ang. fluorescence spillover), zwłaszcza tych o dużej intensywności. Kwestią dyskusyjną jest również bramkowanie w analizie cytofluorymetrycznej populacji komórek mieloidalnych naciekających guz w oparciu o parametry morfologiczne FSC/SSC (Ryc.18), a nie w oparciu o ekspresję antygenu leukocytarnego CD45, którego fluorescencję można by wykorzystać jako „threshold”, odcinając w ten sposób zbieranie danych z komórek innych niż leukocyty. Pewnym skrótem myślowym jest również określenie lizatów z komórek nowotworowych, używanych do stymulacji efektorowych limfocytów T śledziona, pojęciem „antygenów nowotworowych”, sugerującym raczej zastosowanie oczyszczonych peptydów, charakterystycznych dla niektórych typów nowotworów.

Przebieg procedur badawczych na modelu zwierzęcym został należycie opisany i dodatkowo zilustrowany czytelnymi schematami doświadczeń. Mankamentem tej części rozdziału jest jednak brak informacji o liczbie zwierząt wykorzystanych do badań oraz liczebności poszczególnych grup eksperymentalnych.

Kolejny rozdział – „Wyniki”, to najobszerniejsza część pracy. Doktorantka na 41 wielosegmentowych, a przy tym czytelnych, wykresach przedstawiła wyniki swoich badań. Rozdział ten jest bardzo rozbudowany i wielowątkowy, podzielony na szereg podrozdziałów tematycznych, nie zawsze jednak logicznie połączonych. Ma on niestety również szereg innych mankamentów, na które z obowiązku recenzenta muszę zwrócić uwagę. Rozdział ten Doktorantka rozpoczyna od oceny skuteczności wybranych 3 sekwencji shRNA w wyciszaniu ekspresji IL-10 w BMDC i MDSC (Ryc.9), choć informacja o sposobie ich różnicowania *in vitro* z komórek szpiku kostnego pojawia się znacznie dalej (w przypadku MDSC dopiero w kolejnym podrozdziale). Analizując zestawienie danych przedstawionych na Ryc.9, zastanawia mnie brak istotności statystycznej przy wynikach badań stężenia i względnego poziomu ekspresji mRNA dla IL-10 w MDSC transdukowanych wektorami kodującymi różne sekwencje shRNA przy porównaniu do grupy kontrolnej (Ryc.9C i 9D) (istotność stwierdzono jedynie przy ocenie wpływu shIL-10-3 na stężenie produkowanej IL-10). W tym kontekście istotnym byłoby podanie liczby powtórzeń (n) poszczególnych oznaczeń. Pomocna byłaby też informacja czy miarą rozrzutu przedstawionych na wykresach wyników jest SD czy SEM. Uwagi te dotyczą wszystkich rysunków. Przy braku istotności statystycznej również dla analogicznych pomiarów ekspresji mRNA w BMDC stwierdzenie Doktorantki, iż „Z uwagi na to, że zarówno w BMDC, jak i MDSC największą wydajność wyciszenia IL-10 uzyskano po transdukcji wektorami zawierającymi trzecią sekwencję shRNA (shIL-10-3), to te wektory wybrano do dalszych etapów badań”, wydaje się nie w pełni uzasadnione, gdyż jest ono prawdziwe tylko dla oznaczeń IL-10 na poziomie białka. W moim odczuciu, ta sprzeczność wyników na poziomie mRNA i białka wymaga dodatkowego komentarza.

Dalej Doktorantka przedstawia wyniki badań wpływu „wyciszenia ekspresji IL-10” w BMDC na ich zróżnicowanie, zdolność do prezentacji antygenu i indukcję swoistej odpowiedzi przeciwnowotworowej przez limfocyty T. W kontekście mojej ostatniej uwagi bardziej adekwatne byłoby jednak użycie w odniesieniu do transdukowanych BMDC

sformułowania „DC z obniżoną produkcją IL-10” niż „wyciszoną ekspresją IL-10”. Na końcu podrozdziału Autorka podsumowuje krótko uzyskane rezultaty badań, choć pojawiają się tu konkluzje nie znajdujące potwierdzenia w prezentowanych wynikach. I tak, stwierdzenie, iż BMDC/shIL-10 charakteryzowały się zwiększoną ekspresją cząsteczek kostymulujących CD80 i CD86, nie jest do końca prawdziwe, gdyż tylko ekspresja CD86 po transdukcji wektorem dla shIL-10 ulegała statystycznie istotnym zmianom na powierzchni BMDC. Takiej zależności w odniesieniu do CD80 nie wykazano (Ryc.10B dolny panel). Podobnie, niewłaściwie zostały podsumowane wyniki oceny ekspresji markera CD107a na powierzchni subpopulacji CD4+ i CD8+ śledzionowych limfocytów T po ich aktywacji przez transdukowane i stymulowane lizatami komórek nowotworowych BMDC (BMDC/shIL-10/TAg). W podsumowaniu tym Doktorantka konkluduje, iż „limfocyty T CD4+ i CD8+ stymulowane za pomocą BMDC/shIL-10/TAg wykazywały większą zdolność do wydzielania ziaren cytolitycznych niż limfocyty hodowane w obecności BMDC/TAg lub BMDC/shN/TAg”, choć dane przedstawione na Ryc.12B jednoznacznie wskazują, iż taka zależność występuje tylko w odniesieniu do limfocytów CD4+. Tak więc, wydaje się, iż zahamowanie produkcji IL-10 w BMDC nie miało istotnego wpływu na zdolność limfocytów T CD8+ do wydzielania ziaren cytolitycznych wobec komórek nowotworowych, a obserwowana cytotoksyczność jest w głównej mierze wynikiem aktywności limfocytów T CD4+.

Kolejny podrozdział dotyczy wpływu zahamowania produkcji IL-10 na różnicowanie komórek szpiku kostnego myszy w kierunku populacji MDSC oraz ich aktywność w warunkach *in vitro*. Na Ryc.13 Autorka przedstawiła charakterystykę fenotypową badanych populacji, analizując ekspresję cząsteczek MHC klasy II, CD86, F4/80 i PD-L1. W analizie tej trudno jednak zinterpretować przedstawione wyniki, gdyż na wykresach pokazujących nałożone histogramy intensywności fluorescencji badanych markerów („overlays”), na populacjach DC, M-MDSC i PMN-MDSC nie uwzględniono kontroli negatywnych, względem których należałoby oszacować poziom ekspresji tych antygenów. Ponadto, dysproporcje w liczbie komórek poszczególnych populacji (bardzo zróżnicowana wysokość histogramów) dodatkowo utrudniają obiektywną ocenę tych danych. Na tym etapie, istotnym byłoby również sprawdzenie, która populacja MDSC ma obniżoną/zahamowaną produkcję IL-10 w największym stopniu, bowiem w dalszych częściach tego rozdziału Doktorantka porównuje funkcje subpopulacji MDSC, mogących jednak po transdukcji, różnić się poziomem produkcji IL-10 w znaczący sposób. Analizując „wpływ wyciszenia ekspresji IL-10 na poziom zróżnicowania MDSC” zastanawia mnie wysoki, w porównaniu z innymi populacjami, sięgający prawie 20%, odsetek komórek CD11c dodatnich dla EGFP (określającego wydajność transdukcji), a stanowiących grupę kontrolną bez obecności wektorów lentiwirusowych (Ryc.14B). Tak wysoki poziom świecenia tła tej populacji wymaga skomentowania.

Interpretacja wyników kolejnego podrozdziału, pt. „Ocena aktywności supresorowej MDSC z wyciszoną ekspresją IL-10 wobec limfocytów T” pozostawia wiele do życzenia. Po pierwsze, przy ocenie proliferacji splenocytów w obecności M-MDSC i PMN-MDSC transdukowanych wektorem blokującym ekspresję IL-10 (Ryc.15), pomimo stwierdzenia braku statystycznie istotnych różnic pomiędzy grupami, Doktorantka w podsumowaniu tego etapu badań ponownie dokonuje nadinterpretacji, kategorycznie stwierdzając, iż „M-MDSC z wyciszoną ekspresją IL-10 wykazywały zwiększoną aktywność supresorową wobec splenocytów, co skutkowało zahamowaniem proliferacji limfocytów CD4+ i CD8+” oraz „PMN-MDSC pod wpływem wyciszenia IL-10 utraciły aktywność supresyjną” (str.81).

Również kolejne stwierdzenie Doktorantki: „w nadsączach znad hodowli splenocytów z komórkami PMN-MDSC/shIL-10 stężenie IFN- γ było wyższe niż w przypadku pozostałych hodowli”, nie znajduje potwierdzenia w przedstawionych wynikach. Nie jest też jasne na jakiej zasadzie, zdaniem Autorki „obecność tej cytokiny w środowisku wydaje się być ważna dla indukcji aktywności supresorowej PMN-MDSC”.

Kolejna część wyników dotyczy badań prowadzonych na modelu zwierzęcym i bezpośrednio odnosi się do tytułu rozprawy. Tę część Doktorantka rozpoczyna od „Określenia aktywności komórek układu odpornościowego po doguzowym podaniu wektorów wyciszających ekspresję IL-10” i przedstawia wydajność transdukcji różnych populacji leukocytów naciekających guz *in vivo*, mierzoną średnią intensywnością fluorescencji białka EGFP (Ryc.17 C-F). W tym kontekście nie można jednak mówić o „wydajności wyciszenia IL-10”, nie wiadomo bowiem w jakim stopniu badane populacje leukocytów miały obniżoną produkcję IL-10 po transdukcji *in vivo* (pomiar produkcji IL-10 przez komórki guza – Ryc.17 G-H, nie daje odpowiedzi na to pytanie). Choć komplementarne dane pokazujące udział procentowy wybranych populacji leukocytów w obrębie guza (TAM, DC, M-MDSC, PMN-MDSC) przedstawiono nieco dalej (Ryc.19), w dalszym ciągu nie wiadomo jednak jaki był wśród nich odsetek komórek transdukowanych (EGFP+), jaki był stopień efektywnego wyhamowania w nich produkcji IL-10 po zabiegu doguzowego podania wektorów lentiwirusowych i jak długo efekt ten się utrzymywał. Bez tych informacji trudno wnioskować o mechanizmach leżących u podstaw stosowanej immunoterapii.

W tej części badań ciekawych danych dostarczyła analiza samego składu odsetkowego leukocytów naciekających guzy po podaniach wektorów lentiwirusowych. Szczególnie istotny jest tu spadek zawartości TAM w obrębie guza, obserwowany jednak niezależnie od rodzaju użytego wektora. Podobnie, niezależny od specyficzności użytego shRNA był spadek ekspresji cząsteczek MHC klasy II na DC i M-MDSC po doguzowym podaniu wektorów (w przypadku tych drugich, obserwowany tylko w krótkim schemacie terapii, a nie jak interpretuje Doktorantka również w dłuższym). Dane te pozostają jednak w sprzeczności z wynikami uzyskanymi w warunkach *in vitro*, gdzie po transdukcji wektorami lentiwirusowymi obserwowano wyraźny wzrost ekspresji MHC klasy II na DC i taką tendencję na M-MDSC. Potencjalne przyczyny takiej rozbieżności powinny zostać przedyskutowane.

Dalej Doktorantka analizuje aktywność komórek mieloidalnych izolowanych z guza, oceniając ich zdolność do hamowania proliferacji limfocytów T CD4+ i CD8+, zdolność do własnych podziałów komórkowych oraz produkcji reaktywnych form tlenu *in vitro*. We wszystkich populacjach leukocytów oznaczano również poziom ekspresji czynnika transkrypcyjnego IRF8, charakterystycznego dla komórek różnicujących się w kierunku makrofagów, a dojrzałe makrofagi F4/80, charakteryzowano pod względem typu polaryzacji w oparciu o ekspresję antygenu CD206. W tym przypadku wyjaśnienia wymaga, dlaczego we wcześniejszych badaniach oceniających wpływ transdukcji komórek mieloidalnych wektorami lentiwirusowymi na ich różnicowanie *in vitro*, analizując różnicowanie w kierunku makrofagów Doktorantka oceniała ekspresję markera F4/80 (Ryc.14), a nie czynnika IRF8. Wyjaśnienie tego aspektu jest istotne dla spójności prowadzonych badań. W odniesieniu do oceny aktywności supresorowej komórek mieloidalnych izolowanych z guzów po doguzowych cyklach podań wektorów lentiwirusowych, zastanawia mnie brak istotności statystycznej pomiędzy grupami badanymi a kontrolą na wykresach przedstawiających wpływ kom. mieloidalnych na proliferację limfocytów T CD8+ oraz uwalnianie IFN- γ , w krótkim schemacie terapii (Ryc.21 B-C), podczas gdy zgrubna analiza wizualna wskazywałaby na

występowanie takiej zależności, zwłaszcza w kontekście analogicznych wyników prezentowanych dla dłuższego schematu terapii (Ryc.21 F-G). W rozwianiu tych wątpliwości znowu bardzo pomocna byłaby informacja o liczbie powtórzeń (n) poszczególnych oznaczeń. Kolejno, Doktorantka oceniała skład ilościowy subpopulacji komórek limfoidalnych w guzach, wartowniczych węzłach chłonnych oraz śledzionach zwierząt, biorąc pod uwagę również zdolność tych komórek do produkcji IL-10 i IFN γ (węzły chłonne i śledziona) oraz aktywność cytotoksyczną względem syngenicznych komórek raka jelita grubego *in vitro* po restymulacji (śledziona). I tu, zmiany w odsetku limfocytów T reg w nacieku guza (obserwowane przy przedłużonym schemacie podawania wektorów), wzrost poziomu limfocytów T efektorowych oraz zmiany w produkcji IFN γ w zależności od cyklu podawania, czy wzrost aktywności cytotoksycznej splenocytów względem komórek nowotworowych oraz obserwowaną tendencję w kierunku polaryzacji makrofagów o typie M1 (w guzie), były związane z samym podawaniem wektorów, a nie bezpośrednio z zahamowaniem produkcji IL-10. Świadczy to o aktywacji układu odpornościowego po lokalnym podaniu wektorów lentiwirusowych, a wyraźnie zaznaczony spadek wartości stosunku produkcji IFN γ /IL-10 w węzłach chłonnych i śledzionie występujący przy przedłużonym schemacie podań wektorów może być wynikiem „wyczerpania” limfocytów T na skutek długotrwałej ekspozycji na antygeny wirusowe. Szkoda, iż w analogicznych schematach, Doktorantka nie pokusiła się o analizę produkcji IFN γ i IL-10 przez limfocyty izolowane z guzów nowotworowych. Do pełni obrazu składu populacji limfoidalnych, zwłaszcza w węzłach chłonnych i śledzionie, brakuje mi również wyników oceny poziomu limfocytów B, mimo, że barwienia w kierunku komórek CD19+ były wykonywane. Dyskusyjny jest też sposób identyfikacji komórek NKT, ze względu na fakt, iż limfocyty T CD8+ mogą również wykazywać ekspresję antygeny DX5 (CD49b), zwłaszcza w odpowiedzi na stymulację antygenami wirusowymi. Właściwa identyfikacja komórek NKT powinna opierać się na ich znakowaniu multimerami (np. pentamerami) CD1d swoistymi dla ceramidu α -GalCer.

Kolejny podrozdział opisuje badania analogicznych aspektów, ale po wzbogaceniu na samym wstępie stosowanych wcześniej schematów terapii, o jednokrotne dootrzewnowe podanie cyklofosfamidu. W porównaniu z poprzednim protokołem, podanie cyklofosfamidu pozytywnie wpłynęło na szereg badanych parametrów, m.in. pozwoliło na wyraźne obniżenie stężenia produkowanej przez komórki guza IL-10 w grupie zwierząt otrzymujących doguzowo wektor hamujący produkcję IL-10 w przedłużonym schemacie terapii. Zastanawiającym jest tu jednak fakt braku istotnego wpływu na produkcję IL-10 samego cyklofosfamidu (zarówno w krótkim, jak i przedłużonym schemacie), o czym od dawna donoszą liczne publikacje z tego tematu. Przy opisie uzyskanych na tym etapie badań wyników Doktorantka ponownie nie ustrzegła się ich nadinterpretacji, np. w odniesieniu do oceny odsetka TAM w grupach otrzymujących cyklofosfamid lub cyklofosfamid i wektory lentiwirusowe (Ryc.29A), pisząc iż „W doświadczeniu przeprowadzonym wg krótkiego schematu podań wektorów, w grupach, które otrzymały CY lub CY i LV odnotowano znaczne obniżenie odsetka TAM w odniesieniu do grupy kontrolnej” (str.98), podczas gdy w rzeczywistości był to raczej trend, bez istotności statystycznej. Niezrozumiała jest też interpretacja wyników z pomiarów aktywności supresyjnej komórek mieloidalnych izolowanych z guzów (Ryc.30) – „Zdolność komórek mieloidalnych izolowanych z guzów MC38 do hamowania proliferacji limfocytów T CD4+ i T CD8+ uległa obniżeniu po zastosowaniu CY w kombinacji z wektorami LV, co było obserwowane zarówno 6-go, jak i 10-go dnia po rozpoczęciu podań”. Tymczasem, w odniesieniu do krótkiego schematu terapii,

nawet w zgrubnej ocenie wizualnej tych wyników, trudno byłoby doszukać się pomiędzy nimi różnic, a w przypadku dłuższego schematu, opisywane zmiany dotyczyły tylko limfocytów CD8+.

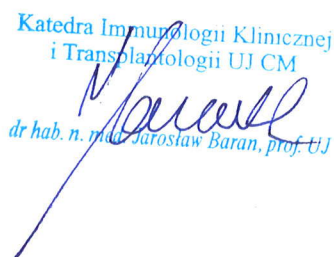
W grupie wyników z tego podrozdziału dotyczących badania składu i aktywności komórek limfoidalnych w guzach, interesująca jest obserwacja wzrostu odsetka limfocytów T CD8+ i komórek NK w obrębie guza po podaniach wektorów lentiwirusowych i cyklofosfamidu w schemacie przedłużonej terapii. Potwierdza ona, iż obserwowany efekt jest związany z immunogennym działaniem samych wektorów, spotęgowanym działaniem cyklofosfamidu. Wśród tych wyników, zastanawiający jest natomiast brak wpływu samego cyklofosfamidu na poziom limfocytów T reg, o którym Doktorantka szeroko pisała we Wstępie rozprawy. Z kolei, w odróżnieniu od wyników analogicznych doświadczeń przeprowadzonych bez użycia cyklofosfamidu, dodatek tego cytostatyku do schematu terapii wyraźnie zwiększył zdolność transdukowanych wektorami lentiwirusowymi zarówno limfocytów T (CD4+ i CD8+), jak i komórek NK śledziona do wydzielania ziaren cytotoxicytnych. Dodatkowo potwierdza to rolę cyklofosfamidu w nasileniu ogólnej reakcji odpornościowej (śledziona) na antygeny wirusowe wektorów. W moim odczuciu, połączenie w jedną całość (jeden podrozdział) opisu wyników eksperymentów bez cyklofosfamidu i z jego wykorzystaniem, byłoby bardziej logiczne i ułatwiłoby porównanie wyników w obu schematach, tym bardziej, iż sama Doktorantka wyniki obu tych podrozdziałów podsumowuje łącznie.

Ostatnie dwa podrozdziały przedstawiają wyniki badań *in vivo* nad skutecznością immunoterapii z wykorzystaniem wektorów hamujących produkcję IL-10, podawanych doguzowo oraz DC stymulowanych *in vitro* lizatami komórek nowotworowych MC38, a także, takiej formy terapii wzbogaconej o cyklofosfamid (chemioimmunoterapia). Doktorantka ocenia tu analogiczne parametry jak w poprzednich podrozdziałach, dodatkowo analizując wpływ stosowanej terapii na wielkość guzów podskórnych u zwierząt. Moim zdaniem jest to najważniejsza część rozprawy, pozwalająca na bezpośrednie powiązanie obserwowanych zmian na poziomie komórkowym z rozwojem nowotworu. W rozdziałach tych, zastanawiająca jest dla mnie jednak rozbieżność wyników uzyskanych dla tych samych grup zwierząt na różnych etapach prowadzonych badań. I tak, na Ryc.36 Doktorantka prezentuje wyniki składu procentowego komórek mieloidalnych naciekających guzy u myszy poddanych immunoterapii z DC i wektorami lentiwirusowymi, gdzie grupa kontrolna zwierząt (ctrl) oraz grupy otrzymujące doguzowo tylko wektory lentiwirusowe (LV shN i LV shIL-10) są takie same, jak w przypadku doświadczeń z użyciem tylko wektorów lentiwirusowych, których wyniki przedstawiono na Ryc.19B. Wyniki tamte różnią się jednak istotnie w stosunku do tych na Ryc.36, zwłaszcza w odniesieniu do oznaczeń TAM i PMN-MDSC. Ta sama uwaga dotyczy analogicznych danych z doświadczeń bez i po włączeniu do terapii cyklofosfamidu, prezentowanych odpowiednio na Ryc.29 i Ryc.43. Te wyraźne niespójności świadczą niestety o małej powtarzalności prezentowanych w rozprawie obserwacji. Ponadto, z niejasnych przyczyn, do oceny aktywności restymulowanych komórek śledziona u myszy poddanych chemioimmunoterapii, Doktorantka wprowadziła do analizy nowy parametr – odsetek limfocytów T populacji CD4 i CD8, dodatnich dla T-bet i IFN γ (Ryc.49). Ocena tego parametru tylko dla tej wybranej części badań nie ma niestety żadnego odniesienia do wcześniejszych wyników i na tej podstawie nie można wnosić o jego znaczeniu. W podsumowaniach tych podrozdziałów Doktorantka po raz kolejny dokonuje nadinterpretacji swoich wyników, stwierdzając m.in. „tylko w grupie CY+BMDC/Tag+LV shIL-10 potwierdzono polaryzację makrofagów w kierunku komórek typu M1” (str.131). Komentarz

ten odnosi się zapewne do Ryc.44, na której faktycznie widać, iż dla tej grupy zwierząt obserwowano najwyższą średnią stosunku M1/M2, niemniej ze względu na wysokie rozrzuty wyników, wartość ta istotnie nie odbiegała od pozostałych grup. Podobnie Wnioski, rekapitulujące wyniki przedstawionych w całej rozprawie badań sformułowane są w dużej mierze „na wyrost”.

Niezależnie od wszystkich wspomnianych powyżej mankamentów pracy, w tym zwłaszcza dotyczących nadinterpretacji wyników, jako recenzent muszę również zwrócić uwagę na dodatkowy, moim zdaniem kluczowy aspekt. Wyselekcjonowane wyniki przedstawionych w rozprawie badań (Ryc.9A-B, Ryc.17C i 17E, Ryc.19B i 19D, Ryc.24A, Ryc.35A-E, Ryc.41A-F, Ryc.42A-E, Ryc.43A-D, Ryc.44, Ryc.45A-D, Ryc.46A-D, Ryc.47A-D, Ryc.48A-F i Ryc.49A-D i 49F) zostały już opublikowane w prestiżowym czasopiśmie *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research* w 2018 roku. Doktorantka nie jest jednak autorem wiodącym tej publikacji, a fakt uprzedniego jej wykorzystania w postępowaniu habilitacyjnym Promotora Doktorantki, nasuwa poważne wątpliwości co do oryginalności przedstawionych w rozprawie wyników i możliwości ich wykorzystania w kolejnym postępowaniu awansowym.

Biorąc powyższe pod uwagę, moja końcowa ocena rozprawy doktorskiej mgr inż. Natalii Anger-Góry nie może być pozytywna.

Katedra Immunologii Klinicznej
i Transplantologii UJ CM

dr hab. n. med. Jarosław Baran, prof. UJ

Kraków, 27.07.2020