



Warszawa, 28.06.2020

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr inż. Natalii Anger-Góry 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”

wykonanej w Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk pod kierunkiem promotora Pani dr hab. Joanny Rossowskiej

Immunoterapia oparta na szczepionkach przeciwnowotworowych zawierających komórki dendrytyczne to bardzo obiecująca forma terapii, dająca nadzieje na skuteczną walkę z rakiem. Obecnie schematy immunoterapii rozszerza się również o zastosowanie chemioterapeutyków, takich jak cyklofosfamid w dawkach immunomodulujących, aby zwiększyć jej skuteczność. Inną formą poprawy efektywności tej terapii jest neutralizacja czynników supresorowych w nowotworze, takich jak interleukina 10. Cytokina ta w mikrośrodowisku nowotworowym (TME) może wykazywać działanie pronowotworowe poprzez indukcję supresorowych limfocytów T regulatorowych i makrofagów towarzyszących nowotworowi (TAM), blokowanie wytwarzania cytokin typu Th1, a także hamowanie dojrzewania komórek dendrytycznych (DC). Stąd też wybór tematu rozprawy mgr inż. Natalii Anger-Góry 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 materiałów i metod, wyników, dyskusji, wniosków oraz spisu rycin, tabel i piśmiennictwa. Na początku rozprawy zamieszczony został wykaz opublikowanych prac, w których Doktorantka jest pierwszym autorem lub współautorem oraz informacja o finansowaniu badań z projektów grantowych.

Praca jest bardzo dobrze napisana, jasnym, przejrzystym i bardzo poprawnym językiem, co sprawia, że z łatwością i przyjemnością można śledzić informacje w niej przedstawione. Wykorzystanie bogatej bazy danych literaturowych świadczy o bardzo dobrej znajomości tematyki oraz dojrzałym warsztacie badawczym Doktorantki.

We wstępie Autorka opisuje rolę układu odpornościowego w powstawaniu nowotworu, ze szczególnym uwzględnieniem roli mikrośrodowiska nowotworowego w progresji tej choroby. Autorka skupia uwagę na komórkach odpowiedzialnych za tworzenie immunosupresyjnego środowiska nowotworowego takich jak: limfocyty T regulatorowe, komórki supresorowe



pochodzenia mieloidalnego (MDSC) oraz makrofagi związane z nowotworem. W tym kontekście Autorka szczegółowo opisuje rolę IL-10 w mikrośrodowisku nowotworu, zarówno immunosupresorową, związaną m.in. z zahamowaniem dojrzewania komórek dendrytycznych i aktywności limfocytów T, jak i immunostymulującą. Następnie Autorka przechodzi do wyjaśnienia założeń immunoterapii przeciwnowotworowej z wykorzystaniem komórek dendrytycznych i ograniczeń tej formy terapii, wskazując kierunki poprawy skuteczności leczenia poprzez m.in. zmniejszenie stężenia IL-10 w obrębie nowotworu. W sposób przejrzysty opisuje metody służące do neutralizacji tej cytokiny w mikrośrodowisku nowotworu, ze szczególnym naciskiem na wykorzystanie zjawiska interferencji RNA i wektorów lentiwirusowych jako nośników shRNA. Wstęp kończy zwięzły opis immunomodulujących właściwości cyklofosfamidu.

Dodatkowo, informacje zawarte we wstępie zostały zilustrowane **niezwykle starannie przygotowanymi i efektownymi rycinami**, które są utrzymane w jednolitym stylu, co ułatwia zrozumienie skomplikowanych zależności w mikrośrodowisku nowotworowym, a także roli badanych komórek i czynników.

Następnie, po krótkim uzasadnieniu problematyki badawczej, Autorka jasno formułuje cel pracy, który został podzielony na 5 zadań badawczych, składających się w spójną całość, zwieńczoną najbardziej ciekawą częścią pracy dotyczącą określenia efektu przeciwnowotworowego immunoterapii oraz chemioimmunoterapii z udziałem odpowiednio szczepionkowych komórek dendrytycznych i wektorów wyciszających IL-10 oraz cyklofosfamidu.

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 bardzo dobrze uporządkowane i przedstawione w postaci przejrzystych tabel. Jasno i zrozumiale opisane są doświadczenia terapeutyczne z wykorzystaniem myszy laboratoryjnych; bardzo pomocne w tym zakresie są klarowne schematy doświadczeń.

Wyniki przeprowadzonych badań zostały zaprezentowane w 6 podrozdziałach i stanowią najbardziej obszerną część pracy. Po każdym podrozdziale Autorka umieściła zwięzłe podsumowanie, które pozwala na uporządkowane śledzenie wyników i ułatwia zrozumienie dyskusji.

W pierwszym podrozdziale Autorka przedstawiła wyniki analizy wydajności wyciszenia ekspresji IL-10 w komórkach dendrytycznych pochodzenia szpikowego (BMDC) oraz komórkach supresorowych pochodzenia mieloidalnego (MDSC) za pomocą wektorów kodujących 3 różne sekwencje shRNA dla IL-10. Badania te pozwoliły na wybór odpowiedniego wektora i zastosowanie go w kolejnych doświadczeniach. W pracy napisano iż wybrano komórki BMDC



oraz MDSC gdyż są one wrażliwe na działanie IL-10, jednak istotne może być też zbadanie jaki wpływ mają wybrane wektory na inne subpopulacje komórek stanowiące źródło tej cytokiny w TME. W tej części nasuwa się więc pytanie **czy zasadne byłoby sprawdzenie wydajności wyciszenia ekspresji IL-10 za pomocą wybranego wektora także w innych komórkach układu odpornościowego, które są również obecne w TME i wydzielają badaną cytokinę, tj. limfocytach T (zwłaszcza limfocytach T regulatorowych) i makrofagach związanych z nowotworem lub makrofagach typu M2? Czy takie badania możliwe byłyby bez konieczności indukowania nowotworu u myszy, wykorzystując limfocyty i monocyty z krwi?**

W kolejnych podrozdziałach Autorka opisuje aktywność odpowiednio komórek dendrytycznych oraz MDSC z wyciszoną ekspresją IL-10 w warunkach *in vitro*. Wskazuje, że komórki dendrytyczne stymulowane antygenami nowotworowymi przy wyciszeniu ekspresji IL-10 wykazują zwiększoną ekspresję cząsteczki kostymulującej (CD86) i indukują zwiększoną aktywność cytotoksyczną splenocytów wobec komórek rakowych (MC38). Istotne jest zaznaczenie, iż dopiero na etapie dyskusji Autorka podejmuje ważny aspekt badań polegający na rozróżnieniu efektów faktycznego wyciszenia ekspresji IL-10, a efektów jakie mogą wykazywać ogólnie wektory lentiwirusowe (LV), w przypadku przeprowadzonych badań wektor kontrolny – shN, na komórki dendrytyczne, a w dalszych badaniach m.in. na naciek limfocytarny w guzach nowotworowych.

Następnie Autorka przedstawia charakterystykę uzyskanych MDSC, co istotne i ciekawe zastosowana metodyka pozwoliła Doktorantce na uzyskanie monocytarnych oraz granulocytarnych MDSC (M-i PMN-MDSC). W tej części prezentowane są m.in. wyniki pokazujące wpływ MDSC z wyciszoną lub nie ekspresją IL-10 na intensywność proliferacji limfocytów T (Ryc.15) i produkcję cytokin przez splenocyty (Ryc. 16), w których nie wykazano istotnych statystycznie różnic pomiędzy grupami. Niemniej jednak, w opisie wyników Autorka stwierdza zmniejszenie i zwiększenie intensywności proliferacji oraz produkcji cytokin odpowiednio dla transdukowanych M-MDSC i PMN-MDSC. W przypadku braku istotności statystycznej można mówić jedynie o tendencji wzrostowej bądź spadkowej w intensywności proliferacji, a nie o faktycznym efekcie. Podobnie w przypadku sekrecji cytokin przez splenocyty. Jeżeli nie udało się uzyskać istotności ze względu na duże różnice między doświadczeniami, być może należało użyć innych narzędzi matematycznych (np. określić procent spadku/wzrostu stężenia badanej cytokiny w poszczególnych grupach, zamiast analizować jej stężenie bezwzględne w pg/ml). **W związku z powyższym, przy braku wykazania istotności statystycznej, rezultaty tej części badań należałoby uznać za niekonkluzywne, co powinno zostać również uwzględnione w dyskusji.**

W kolejnych podrozdziałach mgr inż. Natalia Anger-Góra przedstawia wyniki badań *in vivo*, stanowiących główny aspekt pracy. W pierwszej kolejności opisuje wpływ doguzowego podania wektorów wyciszających ekspresję IL-10 na aktywność komórek układu



odpornościowego, a następnie modulację poprzez wcześniejsze podanie cyklofosfamidu. Doświadczenia przeprowadzone są w dwóch schematach, tzw. „krótkim” i „dłuższym/przedłużonym”, których zastosowanie jest dobrze uzasadnione przez Autorkę w dyskusji. Ponadto należy podkreślić, że zastosowanie jednolitej kolorystyki na wykresach ilustrujących wyniki uzyskane w poszczególnych schematach oraz ryciny ilustrujące plan doświadczeń *in vivo* znacznie ułatwiają śledzenie i zrozumienie prezentowanych wyników. Do tej części pracy mam pytanie dotyczące określenia wydajności wyciszenia w samych guzach nowotworowych za pomocą badania nadsącza znad hodowli pełnej zawiesiny komórek wyizolowanych z guzów. Jak przyznaje sama Autorka w dyskusji, brak zmian w grupie nietraktowanej i traktowanej wektorami lentiwirusowymi może wynikać z niewielkiego odsetka leukocytów (2-5%) w guzie nowotworowym. W związku z powyższym **czy możliwe byłoby wyizolowanie jedynie leukocytów (komórek CD45⁺) i określenie sekrecji IL-10 przez te komórki? Czy wydłużenie czasu hodowli zawiesiny komórek wyizolowanych z guzów z 24 do 72 godzin pozwoliłoby na zaobserwowanie większych zmian?** Dodatkowo w opisie tych wyników w rozdziale 4.4.1 warto byłoby zaznaczyć, że różnice nie były istotne statystycznie.

Ostatnie dwa podrozdziały wyników poświęcone są przedstawieniu wyników złożonych doświadczeń terapeutycznych z zastosowaniem immunoterapii i chemioimmunoterapii. Za pomocą wieloparametrowej analizy z wykorzystaniem cytometrii przepływowej Doktoranta oceniła miejscową oraz ogólnoustrojową odpowiedź przeciwnowotworową po zastosowanej terapii. To kompleksowe podejście do badanego zagadnienia zasługuje na szczególne uznanie i świadczy o wszechstronności Doktorantki oraz dużej wiedzy z zakresu immuno-onkologii.

Na podstawie uzyskanych danych Autorka wyciąga słuszny wniosek, że jedynie terapia obejmująca podanie szczepionkowych komórek dendrytycznych, wektorów lentiwirusowych kodujących sekwencje shRNA dla IL-10 oraz cyklofosfamidu w jednorazowej dawce immunomodulującej skutkuje znacznym zahamowaniem wzrostu mysiego raka jelita grubego i powoduje długotrwały efekt terapeutyczny. Niemniej jednak w części wyników dotyczących zastosowania wektorów LV i szczepionek zawierających komórki dendrytyczne stymulowane antygenami nowotworowymi należało by zaznaczyć, że mimo iż uzupełnienie terapii o szczepionki nie zwiększyło skuteczności terapii z wektorami LV, to jednak zastosowanie wektorów LV znacznie poprawiło skuteczność terapii na bazie komórek dendrytycznych.

Podsumowując, rozdział Wyniki obejmuje 40 złożonych rycin z doświadczeń zarówno w warunkach *in vitro*, jak i *in vivo*. W mojej opinii w opisie wyników Autorka powinna dokładnie określać czy poczynione obserwacje stanowią różnice istotne statystycznie między grupami. Określenia takie w dużej części, choć nie zawsze, uwzględnione są w dyskusji.

W rozdziale Dyskusja Doktorantka w sposób zwięzły i rzeczowy konfrontuje uzyskane wyniki z dostępną literaturą. Jak już wspomniałam w tym rozdziale wyjaśnione są nieścisłości w opisie wyników oraz zagadnienia dotyczące immunogenności wektorów LV i ich ewentualnego



korzystnego wpływu na odpowiedź przeciwnowotworową, ale także ograniczeń ich zastosowania w badaniach klinicznych. Ponadto w dyskusji Autorka podkreśla zalety wykorzystania w prezentowanych doświadczeniach terapeutycznych cyklofosfamidu, który wpływa m.in. na zmianę polaryzacji makrofagów zidentyfikowanych w guzach w kierunku komórek typu M1 i indukuje odpowiedź przeciwnowotworową typu Th1. Należy podkreślić, że praca mgr inż. Natalii Anger-Góry jest kontynuacją bogatych badań z zakresu immunoterapii opartej na komórkach dendrytycznych prowadzonych przez zespół dr hab. Joanny Rossowskiej.

Podsumowując rozdział Dyskusja chciałabym prosić o próbę wy tłumaczenia mechanizmu komórkowego odpowiedzialnego za korzystny efekt terapeutyczny zastosowanego schematu leczenia. Autorka opisuje w pracy kilka istotnie zmienionych parametrów w mikrośrodkowisku nowotworu oraz w lokalnej i ogólnoustrojowej odpowiedzi immunologicznej, lecz który z nich i dlaczego, zdaniem Autorki, może najbardziej wpływać na uzyskane wyniki i który mechanizm może mieć największe znaczenie w zwiększeniu skuteczności zastosowanej terapii, zwłaszcza w kontekście niejednoznacznego działania IL-10 w modulowaniu odpowiedzi immunologicznej?

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. Natalii Anger-Góry są wieloaspektowe doświadczenia terapeutyczne. Stanowią one o bardzo wysokiej wartości rozprawy zarówno w kontekście poznawczym, jak i aplikacyjnym.** Pozwalają na wykorzystanie uzyskanych wyników w projektowaniu nowych protokołów leczenia nowotworów z wykorzystaniem wektorów lentiwirusowych w terapii skojarzonej u pacjentów onkologicznych.

Na podstawie przeprowadzonej analizy rozprawy doktorskiej mgr inż. Natalii Anger-Góry 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). Niniejsza praca stanowi oryginalne opracowanie, które w istotny sposób poszerza wiedzę na temat zastosowania terapii przeciwnowotworowej z wykorzystaniem wektorów lentiwirusowych wyciszających ekspresję IL-10, szczepionkowych komórek dendrytycznych oraz cyklofosfamidu. Uzyskane wyniki mogą znaleźć zastosowanie w opracowaniu bardziej skutecznych protokołów chemioimmunoterapii nowotworów litych. Treść rozprawy wskazuje na wysoki poziom wiedzy naukowej Autorki oraz świadczy o umiejętności samodzielnego prowadzenia badań naukowych. W związku z powyższym, wnioskuję o dopuszczenie mgr inż. Natalii Anger-Góry do dalszych etapów postępowania w przewodzie doktorskim oraz **wnioskuję o wyróżnienie pracy.**

Kinga Majchrzak-Kuligowska

dr hab. Kinga Majchrzak – Kuligowska