

Katedra i Klinika Pneumonologii, Onkologii
i Alergologii
Uniwersytetu Medycznego w Lublinie
ul. Jaczewskiego 8
Lublin 20-950
tel. (81) 724 44 31, (81) 724 42 93
fax (81) 724 48 23
kierownik:
Prof. dr hab. Janusz Milanowski



PAN - Imię i nazwisko:
Wpłynęło dnia: 01-04-2022
L.dz.: 86/22

e-mail: pulm.dept@umlub.pl

Department of Pneumology, Oncology
and Allergology
Medical University of Lublin
Poland, Lublin 20-950
Jaczewskiego 8
tel. (+48-81) 724 44 31, (+48-81) 724 42 93
fax (+48-81) 724 48 23
Head:
Prof. Janusz Milanowski MD, PhD

Lublin, dnia 30.03.2022 r.

Recenzja rozprawy na stopień doktora nauk medycznych

Agnieszki Szczygieł

pt.: „Ocena aktywności przeciwnowotworowej chemioimmunoterapii z udziałem nanokoniugatów metotreksatu oraz szczepionek na bazie komórek dendrytycznych z wyciszoną ekspresją receptora IL-10”

promotor rozprawy: dr hab. Elżbieta Pajtasz-Piasecka, prof. PAN

Wprowadzenie

Na przestrzeni kilkudziesięciu lat doszło do ewolucji koncepcji immunoterapii chorób nowotworowych, polegającej na stopniowym odejściu od metod monoterapii w kierunku zastosowania immunoterapii skojarzonej. Założeniem takiego podejścia terapeutycznego jest wzmocnienie aktywności układu immunologicznego na różnych punktach jego działania oraz uwrażliwienie komórek nowotworowych na tę aktywność. Terapie skojarzone obejmują najczęściej połączenie immunoterapii (z wykorzystaniem inhibitorów immunologicznych punktów kontroli czyli przeciwciał anti-PD-1/anty-PD-L1) z chemioterapią, radioterapią, czy nawet terapiami ukierunkowanymi molekularnie. Najczęściej stosowana jest terapia skojarzona obejmująca dwa różne aktywatory lub inhibitory punktów kontrolnych układu odpornościowego. Podwójna blokada cząsteczek PD-1 i CTLA-4 swoistymi przeciwciałami - niwolumabem i ipilimumabem, jest stosowana w leczeniu czerniaka, raka nerkowokomórkowego i niedrobnokomórkowego raka płuca. Badania kliniczne doprowadziły również do rejestracji połączenia chemioterapii z przeciwciałami anti-PD-1. Taki rodzaj immunoterapii jest szeroko stosowany w leczeniu raka płuca, czerniaka, czy raka piersi. Kolejną metodą immunoterapii skojarzonej jest zastosowanie inhibitorów immunologicznych punktów kontrolnych w połączeniu ze środkami, które modyfikują mikrośrodowisko guza w

sposób niespecyficzny (np. cytokiny prozapalne, immunosupresyjne inhibitory cytokin i 2,3-dioksygenaza indoloaminy). Analizując toczące się badania kliniczne obserwujemy znaczący wzrost liczby badań dotyczących zastosowania terapii skojarzonej o bardzo różnych punktach uchwytu.

W świetle najnowszych badań, podjęta przez Doktorantkę tematyka dotyczy bardzo aktualnego zagadnienia, jakim jest wpływ terapii skojarzonej na aktywność układu immunologicznego oraz pobudzenie jego działania przeciwnowotworowego. Celem prezentowanej pracy było zbadanie efektu terapeutycznego oraz wpływu na aktywność komórek układu immunologicznego skojarzonej terapii z wykorzystaniem nanokoniugatów metotreksatu (MTX) i hydroksyetyloskrobii (HES) oraz komórek dendrytycznych z wyciszoną ekspresją receptora dla IL-10 w mysim modelu raka jelita grubego MC38. Praca pani Agnieszki Szczygieł wpisuje się znakomicie w nurt nowoczesnych badań naukowych, dotyczący poszukiwania nowych form terapii chorób nowotworowych.

Ocena merytoryczna i metodologiczna pracy.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska liczy 186 stron wydruku jednostronnego, ma układ typowy dla tego typu opracowań. Na uwagę zasługuje fakt, że badania zawarte w pracy były finansowane przez Narodowe Centrum Nauki w ramach projektu grantowego Preludium (nr 2015/19/N/NZ6/02908), którego kierownikiem była pani Agnieszka Szczygieł. W spisie treści odnajdujemy wszystkie elementy konstrukcyjne prac doktorskich, czyli rozdział dotyczący spisu stosowanych skrótów, streszczenie pracy w języku polskim i angielskim, wstęp, założenia i cel pracy, materiały i metody, wyniki, dyskusję, wnioski oraz załączniki w formie spisu rycin i tabel. Pewien niedosyt recenzenta budzi bardzo krótkie streszczenie pracy. Wydaje się, że w sposób mało przekonujący zachęca ono do zapoznania się z całością pracy, która jest niezmiernie interesująca. We wstępie doktorantka w bardzo ciekawy i interesujący sposób opisuje fizjologię komórek dendrytycznych, ich udział w odpowiedzi immunologicznej, przytacza przykłady wykorzystania komórek dendrytycznych w immunoterapii chorób nowotworowych oraz bardzo szczegółowo opisuje wady i zalety zastosowania nanokoniugatów w modulacji odpowiedzi przeciwnowotworowej. Wstęp jest wielce ciekawym opracowaniem, uzupełnionym o rysunki, które dodatkowo obrazują opisane przez Doktorantkę treści. Drobne uwagi recenzenta dotyczą błędów interpunkcyjnych oraz kilku nieprecyzyjnie sformułowanych opisów. Przede wszystkim sformułowanie „szczepionkowe komórki dendrytyczne” nie jest trafnym określeniem. Komórki dendrytyczne generowane *in vitro* mogą być podawane jako szczepionki przeciwnowotworowe, ale nie są to szczepionkowe komórki. Doktorantka wskazuje, że stymulacja dziewiczych limfocytów T przez komórki dendrytyczne odbywa się w

synapsie immunologicznej. Zdecydowanie odbywa się w węźle chłonnym, natomiast synapsą immunologiczną nazywamy receptorowe interakcje pomiędzy cząsteczkami na powierzchni limfocytów T a komórką dendrytyczną. Ponadto, Doktorantka opisując mikrośrodowisko nowotworowe wskazuje na dwa immunofenotypy guzów nowotworowych: zimne i gorące. Należy jednak pamiętać, że w literaturze opisywany jest również tzw. podtyp z wykluczeniem, czyli guzy nowotworowe, w których układ immunologiczny marginalnie nacieka tkankę nowotworową, a silne immunosupresyjne mikrośrodowisko nowotworowe nie pozwala komórkom immunologicznym na wniknięcie do wnętrza guza. Są to jedynie drobne uwagi Recenzenta, nie ujmujące wagi tej części rozprawy. Podsumowując, rozdział ten stanowi bardzo zwarte i rzetelne opracowanie, znakomicie wprowadzające czytającego w przedstawione w następnej części badania i wyniki.

W dalszej części pracy Autorka sformułowała bardzo poprawnie główny cel badawczy, którym było zbadanie efektu terapeutycznego oraz zmian zachodzących pod wpływem zastosowania skojarzonej terapii opartej na immunomodulującej dawce nanokoniugatu metotreksatu (MTX) i hydroksyetyloskrobi (HES) oraz komórek dendrytycznych z wyciszoną ekspresją receptora IL-10 w mysim modelu raka jelita grubego MC38. Przedstawiony cel Doktorantka zrealizowała poprzez bardzo starannie zaplanowane etapy badań, które dotyczyły oceny zahamowania wzrostu guzów MC38 oraz pobudzenia aktywności odpowiedzi przeciwnowotworowej w wyniku zastosowania następujących schematów terapeutycznych: 1) monoterapii z wykorzystaniem różnych dawek metotreksatu lub nanokoniugatu MTX-HES, 2) terapii skojarzonej z udziałem MTX lub nanokoniugatów MTX-HES oraz dojrzałych komórek dendrytycznych, 3) terapii skojarzonej z udziałem MTX lub nanokoniugatów MTX-HES oraz komórek dendrytycznych z wyciszoną ekspresją receptora dla IL-10. Ponadto, Doktorantka wykonała badania sprawdzające efektywność procesu wyciszania ekspresji receptora IL-10 na powierzchni komórek dendrytycznych. Podsumowując, założone etapy badań to bardzo ambitne podejście do ustalenia najbardziej efektywnego połączenia chemioterapeutyku z terapią adoptywną w mysim modelu raka jelita grubego.

Rozdział dotyczący wykorzystanych materiałów i przeprowadzonych metod badawczych został podzielony przez Doktorantkę na część techniczną, opisującą przygotowanie linii komórkowych, prowadzenie hodowli, przygotowanie wektorów lentowirusowych, transdukcję komórek dendrytycznych wektorami oraz część terapeutyczną dotyczącą już bezpośrednio terapii zwierząt hodowlanych wg ustalonych wcześniej schematów leczenia. Całość uzupełniona jest schematami, które znakomicie prezentują rozległość zaplanowanych badań i analiz. W tym miejscu muszę bardzo mocno podkreślić moje ogromne uznanie dla Doktorantki przede wszystkim za bardzo logiczne i przemyślane badania oraz wyrazić swój ogromny

podziw dla różnorodności technik, które zostały wykorzystane w pracy. Zaplanowana metodyka zwraca moją szczególną uwagę i zasługuje na ogromne wyróżnienie. Doktorantka wykazała się doskonałą znajomością szerokiego spektrum technik laboratoryjnych, począwszy od prowadzenia hodowli komórkowych, poprzez wykorzystanie cytometrii przepływowej, kończąc na zaawansowanych technikach biologii molekularnej. Pragnę jeszcze raz podkreślić, że jestem pod ogromnym wrażeniem warsztatu badawczego pani Agnieszki Szczygieł, a samo przedstawienie wykonanych przez Autorkę badań zasługuje na szczególną uwagę. Gratuluję!

Jednak wykorzystując możliwość polemiki z Doktorantką, pragnę zapytać Ją jedynie o definicję fenotypową komórek NK, które w pracy opisano na podstawie braku markera CD3 i obecnej cząsteczki CD49b. Czy nie należałoby zanalizować tą populację również pod kątem obecności CD56, który jest markerem bardzo swoistym dla komórek NK? Czy Doktorantka przeprowadziła immunofenotypowanie niedojrzałych komórek dendrytycznych przed stymulacją ich dojrzewania LPS, Tag, PMA czy rmIL-10? Jakie markery mogłaby zaproponować do analizy niedojrzałych mysich DCs?

W opinii recenzenta, wartościowe wyniki badań naukowych cechuje możliwość przełożenia ich na praktykę kliniczną. W tym kontekście, uzyskane przez Doktorantkę rezultaty badań prezentowane w rozprawie doktorskiej z całą pewnością spełniają te wymagania. W pierwszej części rozdziału Wyniki, Doktorantka – zestawiając wyniki proliferacji różnych linii komórkowych, wyjaśnia, dlaczego skoncentrowała się na analizie tylko linii mysiego raka jelita grubego MC38, mimo iż w rozdziale Metodyka opisuje jeszcze dwie linie – CT26 i LL2, co w pierwszej chwili może być mylące dla czytającego. W kolejnych częściach rozdziału Wyniki Doktorantka przedstawiła opis wyników poszczególnych etapów badań, analogicznie do układu przedstawionego w celach pracy. Jest to bardzo logicznie poprowadzona analiza, zilustrowana estetycznie i starannie wykonanymi wykresami oraz przykładowymi schematami przedstawiającymi analizę cytometryczną. Doktorantka z ogromną rzetelnością przeprowadziła szereg stosunkowo skomplikowanych metodycznie badań, począwszy od analizy wielkości guzów nowotworowych po zastosowanie cytometrii przepływowej do analizy wybranych populacji komórek układu immunologicznego. Kompleksowe podejście Doktorantki do podjętego tematu zasługuje na szczególną uwagę i wyróżnienie. Zwracam również uwagę na starannie przeprowadzoną analizę statystyczną uzyskanych wyników.

Rozdział dyskusja poświęcony jest przede wszystkim wnikliwej analizie uzyskanych przez Autorkę wyników z danymi opublikowanymi w literaturze światowej. Dyskusja dowodzi dobrej orientacji Doktorantki w najnowszej literaturze dotyczącej poruszanego problemu, choć Recenzent sugerowałby podzielenie jej na podrozdziały, co ułatwiłoby czytanie tej części rozprawy. Cytowana w pracy literatura należy do aktualnej i jest w większości angielskojęzyczna.

Jednak, Doktorantka nie zastosowała punktacji dla podliczenia pozycji literatury, co nie jest powszechnie przyjętą regułą w tego rodzaju pracach. Uzyskane wyniki umożliwiły Doktorantce postawienie jedynie 3 wniosków, ale wynikają one bezpośrednio z przeprowadzonych badań, są związane z uzyskanymi rezultatami i sformułowano je bardzo zwięźle i bardzo zasadnie.

Wniosek końcowy

Z ogromną satysfakcją stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska pani Agnieszki Szczygieł pt.: „Ocena aktywności przeciwnowotworowej chemioimmunoterapii z udziałem nanokoniugatów metotreksatu oraz szczepionek na bazie komórek dendrytycznych z wyciszoną ekspresją receptora IL-10” stanowi ogromnie interesujące i oryginalne dzieło, w którym Doktorantka dokonała szczegółowej analizy działania przeciwnowotworowego badanych schematów terapii. Praca zrealizowana jest z dużą starannością, jeszcze raz pragnę podkreślić szerokie spektrum zastosowanych technik laboratoryjnych oraz właściwy dobór metod badawczych, co zwraca moją szczególną uwagę. Gratuluję w tym miejscu Doktorantce i oczywiście Pani Promotor.

Praca doktorska magister Agnieszki Szczygieł odpowiada wszelkim wymogom stawianym rozprawie doktorskiej, posiada duże znaczenie naukowe, a wyniki tej pracy mogą w przyszłości znaleźć zastosowanie w praktyce klinicznej.

Wnioskuje do Rady Naukowej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu o dopuszczenie pani magister Agnieszki Szczygieł do dalszych etapów przewodu doktorskiego oraz o wyróżnienie rozprawy doktorskiej (wniosek o wyróżnienie został dołączony do niniejszej recenzji).

Z wyrazami szacunku

Prof. dr hab. n. med. Kamila Wojas-Krawczyk

Katedra i Klinika Pneumonologii, Onkologii i Alergologii

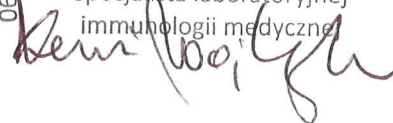
Uniwersytetu Medycznego w Lublinie

Prof. dr hab. n. med. Kamila Wojas-Krawczyk

DIAGNOSTA LABORATORYJNY

specjalista laboratoryjnej
immunologii medycznej

06030



**KATEDRA I KLINIKA PNEUMONOLOGII
ONKOLOGII I ALERGOLOGII**

Uniwersytetu Medycznego w Lublinie

20-954 Lublin, ul. Jaczewskiego 8

tel: (81) 724-44-31, 724-48-39, fax: (81) 724-48-23

e-mail: pulm.dept@umlub.pl