



UNIWERSYTET  
MEDYCZNY  
W ŁODZI



PAN - Instytut Immunologii  
Wpł. dnia 1.7.10..2022.....  
L.dz. ....257.....

Łódź, 26.09.2022

Prof. dr hab. n. med. Ireneusz Majsterek  
Kierownik Zakładu i Katedry  
Zakład Chemii i Biochemii Klinicznej  
Katedra Chemii i Biochemii Medycznej  
Uniwersytet Medyczny w Łodzi

### **Recenzja pracy doktorskiej**

mgr inż. Jagoda Mierzejewska

**Wpływ zastosowania komórek dendrytycznych transdukowanych lentiwirusowymi  
nośnikami genów IL-12 i IL-18 na aktywację odpowiedzi przeciwnowotworowej w modelu  
mysiego raka jelita grubego MC38**

wykonanej w Zakładzie Onkologii Doświadczalnej,

Laboratorium Doświadczalnej Terapii Przeciwnowotworowej

Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. L. Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk

pod kierunkiem naukowym prof. dr hab. Elżbiety Pajtasz-Piaseckiej.



Od wielu lat trwają badania nad wykorzystaniem różnego typu immunomodulatorów w zwiększaniu reaktywności układu odpornościowego u chorych na nowotwory. Jednym z narzędzi terapeutycznych umożliwiającym wprowadzenie zmian w mikrośrodowisku nowotworu są komórki dendrytyczne (DC, ang. *dendritic cells*). Badania nad ich zastosowaniem w indukowaniu swoistej odpowiedzi odpornościowej pozwoliły na opracowanie metod ich aktywacji *ex vivo* za pomocą antygenów nowotworowych, a ich wykorzystanie jako szczepionek dało możliwość zwiększenia reaktywności układu odpornościowego u chorych na nowotwory..

Celem pracy doktorskiej mgr inż. Jagody Mierzejewskiej było opracowanie i określenie wpływu zastosowania szczepionek na bazie komórek dendrytycznych transdukowanych do produkcji IL-12 i/lub IL-18 oraz stymulowanych antygenami nowotworowymi na powstawanie odpowiedzi przeciwnowotworowej w modelu mysiego raka jelita grubego MC38. Biorąc powyższe pod uwagę uważam, że wybór problemu badawczego recenzowanej pracy doktorskiej jest celowy bardzo potrzebny, nie tylko ze względów poznawczych, ale również aplikacyjnych. Uzyskane w ramach niniejszej rozprawy wyniki stanowią ważne uzupełnienie brakującej wiedzy dotyczącej immunoterapii adaptacyjnej w leczeniu nowotworów, co należy uznać za cenny wkład w rozwój onkologii.

Układ rozprawy doktorskiej jest typowy dla prac o charakterze doświadczalnym. Dysertacja jest klasycznym opracowaniem liczącym 225 stron. Składa się 6 rozdziałów oraz wykazu stosowanych skrótów, streszczenia w j. polskim i angielskim, spisu rycin i tabel, piśmiennictwa. Poszczególne rozdziały pracy są logiczne, prawidłowo ułożone i stanowią kompleksową całość. Konstrukcję pracy doktorskiej oparto na 6 głównych rozdziałach zawierających wstęp, wprowadzenie w tematykę realizowanych badań, założenia i cel pracy, szczegółowo opisane materiały i metody oraz zastosowane procedury, wyniki badań, ich dyskusję oraz wnioski. W pracy zamieszczono 92 ryciny oraz 22 tabele. Dobór piśmiennictwa jest prawidłowy i obejmuje najważniejsze pozycje literaturowe z zakresu prowadzonych badań. W pracy zacytowano 196 publikacji naukowych. Proporcje poszczególnych części pracy są adekwatne do charakteru pracy, a uzyskane wyniki zinterpretowano i przedyskutowano prawidłowo. Od strony formalnej praca nie budzi zastrzeżeń. Tytuł pracy koresponduje z wyznaczonym celem i treścią rozprawy. Wstęp stanowi bardzo dobre wprowadzenie w zakres planowanych badań, nakreślając w zarysie genezę



powstania pracy. Przegląd literatury oparty o aktualne i ważne publikacje stanowi niezwykle istotny wkład w pracę oraz potwierdza właściwość zaplanowanych badań.

Doktorantka przedstawiła biologię i migrację komórek dendrytycznych oraz proces aktywacji limfocytów T przez te komórki. Następnie rolę komórek układu odpornościowego procesie nowotworzenia, rolę IL-12 oraz IL-18 w zwalczaniu nowotworu, jak również szczegółowo opisała terapię przeciwnowotworową, w tym wykorzystanie komórek dendrytycznych w immunoterapii oraz immunomodulujące właściwości cyklofosfamidu. Doktorantka wyjaśniła, iż od wielu lat trwają badania nad wykorzystaniem różnego typu immunomodulatorów w zwiększaniu reaktywności układu odpornościowego u chorych na nowotwory. Jednym z narzędzi terapeutycznych umożliwiającym wprowadzenie zmian w mikrośrodowisku nowotworu są komórki dendrytyczne (DC, ang. *dendritic cells*). Badania nad ich zastosowaniem w indukowaniu swoistej odpowiedzi odpornościowej pozwoliły na opracowanie metod ich aktywacji *ex vivo* za pomocą antygenów nowotworowych, a ich wykorzystanie jako szczepionek dało możliwość zwiększenia reaktywności układu odpornościowego u chorych na nowotwory.

Interleukina-12 jest cytokiną produkowaną głównie przez komórki dendrytyczne, makrofagi i limfocyty B, dzięki swojej aktywności tworzy pomost pomiędzy odpornością wrodzoną i adaptacyjną. Biologiczna aktywność IL-12 jest uwarunkowana związaniem do receptora błonowego występującego głównie na powierzchni aktywowanych limfocytów T i komórkach NK, komórkach dendrytycznych oraz limfocytach B. IL-18 jest cytokiną funkcjonalnie podobną do IL-12, wykazuje działanie prozapalne, jednak ze względu na podobieństwo strukturalne została zakwalifikowana do rodziny cytokin IL-1. Jest produkowana jako nieaktywne białko prekursorowe (pro-IL-18) pozbawione peptydu sygnałowego i w tej formie pozostaje wewnątrz komórki. Po przetworzeniu dojrzała forma IL-18 jest wydzielana do otoczenia lub pozostaje związana z błoną komórkową jednak ponad 80% prekursora IL-18 pozostaje nieprzetworzone wewnątrz komórki. Zarówno IL-12, jak i IL-18 są cytokinami o plejotropowym działaniu i właściwościach prozapalnych. IL-12 stymuluje proliferację i aktywację funkcjonalnych limfocytów T i komórek NK oraz wytwarzanie przez te komórki IFN- $\gamma$  i TNF- $\alpha$ . Przyłączenie się IL-12 wydzielanej przez komórki APC do receptora występującego na komórkach docelowych, wzmacnia produkcję IFN- $\gamma$ , który w wyniku korzystnego sprzężenia zwrotnego indukuje zwiększoną produkcję IL-12, co dodatkowo indukuje wydzielanie IFN- $\gamma$  przez APC. Ponadto IL-12 warunkuje różnicowanie



dziewiczych limfocytów T CD4<sup>+</sup> do subpopulacji komórek Th1, wzmagając ich aktywność i proliferację.

Dlatego, zastosowanie w terapii IL-12 jednocześnie z IL-18 przyczynia się do eliminowania ograniczeń obserwowanych przy ich samodzielnym użyciu. Główną funkcją biologiczną IL-18 oraz IL-12 jest zwiększenie produkcji IFN- $\gamma$  przez limfocyty NK, oraz promowanie różnicowania dziewiczych limfocytów T CD4<sup>+</sup> do populacji komórek Th1. Ponadto IL-18 wzmacnia wrodzoną odpowiedź odpornościową poprzez indukcję ekspresji cytokin takich jak GM-CSF, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , w jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej. Podczas rozwoju nowotworu IL-18 może zarówno wspierać odpowiedź odpornościową, ale też promować jego rozwój i przerzutowanie, a wiele komórek nowotworowych wykazuje sekrecję tej cytokiny. Jednym z najważniejszych przykładów synergistycznego działania IL-12 i IL-18 jest korzystny wpływ IL-12 na ekspresję receptora dla IL-18, co w konsekwencji prowadzi do wzmocnienia odpowiedzi wywołanej działaniem samej IL-12.

Cel pracy został przedstawiony precyzyjnie. Celem pracy doktorskiej mgr inż. Jagody Mierzejewskiej było opracowanie i określenie wpływu zastosowania szczepionek na bazie komórek dendrytycznych transdukowanych do produkcji IL-12 i/lub IL-18 oraz stymulowanych antygenami nowotworowymi na powstawanie odpowiedzi przeciwnowotworowej w modelu mysiego raka jelita grubego MC38. Wśród celów szczegółowych mgr inż. Jagoda Mierzejewska wyróżniła charakterystykę komórek dendrytycznych transdukowanych do produkcji cytokin, charakterystykę funkcjonalną komórek szczepionkowych, określenie efektu przeciwnowotworowego opracowanych szczepionek oraz określenie efektu przeciwnowotworowego terapii skojarzonej z udziałem cyklofosfamidu i opracowanych szczepionek.

Część doświadczalna pracy obejmuje przedstawione przez Doktorantkę materiały i metody wykorzystane podczas badań. Materiał badawczy wykorzystany w pracy stanowiły 8-12 tygodniowe samice myszy szczepu C57BL6/J pochodzące z hodowli prowadzonej przez Centrum Medycyny Doświadczalnej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku. Zdrowe zwierzęta, od których pobierany był szpik kostny przeznaczony do hodowli komórek dendrytycznych oraz śledziony wykorzystywane do testów, utrzymywano w standardzie SPF (ang. *Specific Pathogen Free*). Doświadczenia terapeutyczne prowadzono w Zwierzętarni Doświadczalnej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu, za zgodą I Lokalnej Komisji Etycznej.

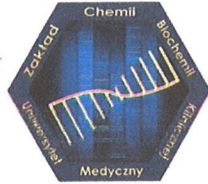


Doktorantka wykonała kompleksową analizę oraz ocenę skuteczności transdukcji komórek dendrytycznych do produkcji cytokin oraz wpływu transdukcji wektorami lentiwirusowymi na zmiany fenotypowe tych komórek. Po wstępnych badaniach *in vitro*, sprawdzona została aktywność komórek szczepionkowych poprzez ocenę zdolności DC do pierwotnego pobudzenia splenocytów w warunkach *in vitro*, określono kinetykę migracji DC do wartowniczych węzłów chłonnych lub infiltrowania tkanki nowotworowej oraz określono kinetykę indukowania odpowiedzi przeciwnowotworowej w warunkach *in vivo*. Doktorantka dokonała także pełnej charakterystyki komórek dendrytycznych transdukowanych do produkcji IL-12 i/lub IL-18 oraz stymulowanych antygenami nowotworowymi, co pozwoliło na opracowanie schematów terapeutycznych mysiego raka jelita grubego MC38.

W ocenie merytorycznej realizacji zmierzonych celów pracy należy podkreślić wysmienie zaplanowany oraz przemyślny proces badawczy, który pozwolił na kompleksowe opracowanie i określenie wpływu zastosowania szczepionek na bazie komórek dendrytycznych transdukowanych do produkcji IL-12 i/lub IL-18 oraz stymulowanych antygenami nowotworowymi na powstawanie odpowiedzi przeciwnowotworowej w modelu mysiego raka jelita grubego, co może mieć kluczowe implikacje dla zastosowania wyników pracy w praktyce klinicznej.

Przeprowadzone badania są wynikiem bezpośredniej współpracy Doktorantki z promotorem pracy Panią prof. dr hab. Elżbietą Pajtasz-Piasecką i odzwierciedlają wysmieniony poziom naukowy kierowanej przez Panią Profesor jednostki naukowej Zakładu Onkologii Doświadczalnej, tym bardziej że temat pracy jest interesujący, ale bardzo wymagający. Do najważniejszych osiągnięć Doktorantki należy zaliczyć autorskie i nowatorskie wyniki, które pozwoliły na opracowanie najskuteczniejszej szczepionki przeciwnowotworowej, na bazie komórek dendrytycznych zdolnych do produkcji IL-12 i/lub IL-18 oraz stymulowanych antygenami nowotworowymi.

Ze szczególnym podkreśleniem należy stwierdzić, że realizacja pracy doktorskiej doprowadziła do kluczowych i przełomowych wniosków końcowych: 1) Komórki dendrytyczne transdukowane za pomocą wektorów lentiwirusowych niosących geny IL-12 i/lub IL-18, stymulowane antygenami nowotworowymi są zdolne do zwiększonej produkcji IL-12 i/lub IL-18 oraz aktywacji swoistej odpowiedzi komórkowej w warunkach *ex vivo*; 2) Komórki szczepionkowe wydzielające cytokiny, a szczególnie DC/IL-12 + IL-18/TA<sub>g</sub>, charakteryzują się zwiększoną zdolnością do naciekania tkanki nowotworowej, a ich jednokrotne, okołoguzowe podanie wykazuje potencjał do aktywacji miejscowej odpowiedzi przeciwnowotworowej; 3) Wielokrotne podanie



DC/IL-12 + IL-18/Tag generuje krótkotrwały efekt terapeutyczny związany ze zmianami w mikrośrodowisku nowotworu oraz aktywację ogólnoustrojowej odpowiedzi odpornościowej; 4) Terapia skojarzona z udziałem cyklofosfamidu i DC/IL-12 + IL-18/Tag prowadzi do wydłużenia czasu zahamowania wzrostu guzów MC38, poprzez zwiększenie wielkości populacji efektorowych limfocytów T i komórek NKT, zmniejszenie udziału procentowego komórek Treg i TAM w tkance guzów, jak i indukowanie ogólnoustrojowej odpowiedzi przeciwnowotworowej.

W odniesieniu do otrzymanych wyników chciałbym zwrócić uwagę na długoczasowy proces rejestracji szczepionek do zastosowania klinicznego, jako immunoterapii w zastosowaniu leczenia celowanego. W Polsce jest to uwarunkowane badaniem klinicznym prowadzonym przez ośrodki Wsparcia Badań Klinicznych akredytowane przez Ministerstwo Zdrowia, przy wsparciu Agencji Badań Medycznych (ABM). Bardzo proszę Doktorantkę, jako rozszerzenie podsumowania merytorycznego zawartego we wnioskach końcowych pracy doktorskiej, o zdefiniowane Jej zdaniem niezbędnych badań przedklinicznych oraz fazy badań klinicznych, które pozwolą na jednoznaczne określenie skuteczności oraz bezpieczeństwa zastosowania transdukowanych lentiwirusowymi nośnikami genów IL-12 i IL-18 komórek dendrytycznych, jako efektywnej szczepionki dla pacjentów onkologicznych.

Podsumowując ocenę rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Jagody Mierzejewskiej, należy ze szczególnym uwzględnieniem podkreślić wartościowy pod względem badań podstawowych, ale przede wszystkim możliwości wykorzystania wyników w praktyce klinicznej temat pracy, który odzwierciedla bardzo wysoką aktywność oraz dojrzałość zawodową Doktorantki. Część eksperymentalna została przeprowadzona właściwie i rzetelnie zgodnie z zaplanowanymi procedurami i odpowiednio dobranymi metodami badawczymi. Oceniana praca charakteryzuje się wysoką wartością naukową i stanowi istotny wkład w dziedzinę onkologii klinicznej. Potwierdzeniem sukcesu są oryginalne wyniki uzyskane podczas realizacji pracy doktorskiej, które wyznaczają pionierskie kierunki badań związane z aktywacją miejscowej odpowiedzi przeciwnowotworowej. W pracy jednoznacznie potwierdzono fakt, że komórki szczepionkowe wydzielające cytokiny, charakteryzują się zwiększoną zdolnością do naciekania tkanki nowotworowej, a ich okołoguzowe podanie wykazuje potencjał do aktywacji miejscowej odpowiedzi przeciwnowotworowej. Projekt rozprawy doktorskiej został przemyślany, a jasno określone cele badawcze doprowadziły do osiągnięcia sukcesu.



Dlatego, chciałbym podkreślić, że dysertacja mgr inż. Jagody Mierzejewskiej stanowi przykład doskonałego modelu współpracy Pani Prof. dr hab. Elżbiety Pajtasz-Piaseckiej oraz Doktorantki, która korzystając z wieloletniego doświadczenia oraz bogatego warsztatu naukowego swojego Promotora osiągnęła wymierne efekty, które z całą pewnością określić można miarą sukcesu. Badania były finansowane z grantu Preludium Narodowego Centrum Nauki, nr projektu 2015/17/N/NNZ4/02834. Opiniowana rozprawa doktorska zasługuje na uznanie, gdyż świadczy o bardzo dobrym przygotowaniu merytorycznym Doktorantki, a jasno określone cele badawcze pozwoliły na uzyskanie istotnych i wiarygodnych wyników.

Podstawę prawną wykonania niniejszej recenzji stanowi uchwała Rady Naukowej Instytutu z dnia 9 grudnia 2021 r. oraz Ustawa z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 z późn. zm.). W podsumowaniu stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 z późn. zm.). Z przyjemnością przedkładam do Wysokiej Rady Naukowej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk, wniosek o dopuszczenie Pani mgr inż. Jagody Mierzejewskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego oraz ze względu na wysoki poziom naukowy tej dysertacji, wnioskuję o wyróżnienie recenzowanej pracy doktorskiej.

Z poważaniem,

KIEROWNIK  
Katedry Chemii i Biochemii Medycznej  
Szpitala Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi  
*[Signature]*  
dr hab. n. med. Ireneusz Majsterak