

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr inż. Małgorzaty Górczak pt. „Przedkliniczne zastosowanie makrofagów jako nośnika leków do guzów litych” przedstawionej do obrony w Szkole Głównej Gospodarstwa Wiejskiego

1. Ocena osiągnięcia naukowego

Cztery najważniejsze filary przeciwnowotworowych strategii terapeutycznych w tym: chirurgiczne usuwanie tkanek nowotworowych, radioterapia, chemioterapia i celowana terapia molekularna w ostatnich latach zostały wzbogacone o dynamicznie rozwijającą się immunoterapię.

Układ odpornościowy nie pozostaje obojętny wobec rozwijającego się nowotworu jednak wraz z rozwojem choroby ulega manipulacji przez komórki nowotworowe, które przejmują kontrolę nad cytotoksycznymi reakcjami komórek immunologicznych, które są głównym mechanizmem obrony przed nadmiernym, niepożądanym rozrostem komórek.

Zjawisko utraty nadzoru immunologicznego i ucieczki komórek nowotworowych spod kontroli układu odpornościowego było przez wiele lat obserwowane jednak jego mechanizmy nie były znane. Dopiero dynamiczny rozwój nauk immunologicznych w ostatnich latach i przede wszystkim zrozumienie mechanizmów regulacyjnych odpowiedzi odpornościowej i naturalnych mechanizmów kontroli aktywacji swoistych limfocytów i komórek odpowiedzi nieswoistej pozwoliły na opracowanie nowych strategii terapeutycznych przywracających lub wyzwalających reakcje cytotoksyczne wobec komórek nowotworowych. Szczególne znaczenie w tym kontekście jest aktualne rozumienie mikrośrodowiska guza nowotworowego i udziału tam obecnych komórek układu odpornościowego. Jednocześnie rozwój biologii molekularnej i technik inżynierii biologicznej pozwolił na produkcję białek rekombinowanych w tym przeciwciał monoklonalnych i modyfikacje genetyczne komórek, czego efektem są skuteczne terapie niektórych nowotworów takich jak przewlekłej białaczki szpikowej i czerniaka prowadzone jako samodzielne terapie lub terapie skojarzone.

Szczególną rolę ostatnio odgrywa adaptacyjny transfer zmodyfikowanych komórek w tym limfocytów T z receptorem CAR w przypadku chłoniaków i ostrej białaczki limfoblastycznej.

Skuteczność immunoterapii opiera się przede wszystkim na ich ukierunkowanym działaniu wykorzystującym swoiste, modyfikowane receptory limfocytów T i B wobec antygenów nowotworowych komórek docelowych.

Z kolei nieswoiste komórki układu odpornościowego a w szczególności makrofagi pełnią rolę komórek naprawczych, fagocytując martwe komórki nowotworowe, ale również mają właściwości cytotoksyczne i pełnią rolę komórek inicjujących lub podtrzymujących stan zapalny niezbędny do utrzymania nadzoru immunologicznego nad komórkami guza .

Makrofagi są najbardziej liczną populacją komórek odpornościowych zasiedlających mikrośrodowisko guza. Z drugiej strony, szczególnie w środowisku beztlenowym łatwo ulegają polaryzacji w kierunku komórek o fenotypie o właściwościach przeciwzapalnych i promujących rozwój guza.

Dlatego biorąc pod uwagę złożoność procesów immunologicznych towarzyszących rozwojowi nowotworów badania podjęte w tej pracy koncentrujące się na unikatowym sposobie wzmocnienia cytotoksycznych właściwości makrofagów są nowoczesne i wpisują się w najnowsze trendy współczesnej terapii onkologicznej.

Głównym celem pracy było określenie czy pozyskane *ex vivo* ludzkie monocyty mogą być skutecznymi nośnikami leku związanego z ludzką ferrytyną w terapii przeciwnowotworowej guzów litych.

Praca stanowi wynik wielu logicznie powiązanych eksperymentów obejmujących podstawowe techniki hodowli i różnicowania monocytów w kierunku makrofagów, ich oceny fenotypowej, zdolności absorpcji badanych preparatów i transferu do komórek nowotworowych a także zaawansowane metody badania skuteczności terapii komórkowej w mysich modelach ludzkich nowotworów.

Przedstawione badania są nowatorskie i są ważnym dowodem wskazującym, że unikalna i niezwykle obiecująca koncepcja terapeutyczna opracowana przez Prof. Magdalenę Król polegająca na wykorzystaniu makrofagów do aktywnego i bezpośredniego transportu leków w kompleksie z ferrytyną do komórek nowotworowych jest możliwa i skuteczna na etapie badań przedklinicznych z zastosowaniem materiału pochodzącego od ludzi.

Kilka kamieni milowych niezbędnych do wprowadzenia tego typu terapii komórkowej zostało osiągniętych przez Panią mgr Małgorzatę Górczak, bowiem wykazano, że:

- izolowane monocyty różnicowane do makrofagów skutecznie internalizują kompleksy ferrytyny z fluorochromami
- kompleks ferrytyna – lek nie jest toksyczny dla samych makrofagów-

- różnicowane makrofagi zamrożone i rozmrożone zachowują zdolność internalizacji kompleksów ferrytyna-lek

- makrofagi skutecznie transferują kompleks ferrytyna – lek do komórek nowotworowych

- makrofagi, zawierające kompleks ferrytyna – lek mają zdolność migracji do tkanki nowotworowej

- podane in vivo myszom w modelu ludzkiego nowotworu jajnika i raka trzustki mają zdolność do penetracji guza i ograniczenia jego wzrostu w porównaniu do preparatów chemioterapeutycznych rutynowo stosowanych w leczeniu tych nowotworów u człowieka.

Całość badań wytycza ścieżkę postępowania, która może być zastosowana w przeskalanowaniu produkcji makrofagów zawierających kompleks ferrytyna dla celów terapeutycznych.

Niewątpliwą zaletą tej pracy jest bogaty wachlarz metodyczny i konsekwentnie prowadzone badania o wzrastającym stopniu trudności począwszy od izolacji komórek a skończywszy na zastosowaniu modeli zwierzęcych w układzie ksenogenicznym.

Na szczególną uwagę zasługują badania przeprowadzone przez Doktorantkę wskazujące zdolność ekstrawazacji makrofagów w głąb guzów w modelach ludzkich nowotworów u myszy i transferu znakowanej ferrytyny do ludzkich komórek linii nowotworowych. Są to w mojej ocenie unikatowe osiągnięcia tej pracy i implikujące do dalszych eksperymentów nad mechanistycznym wyjaśnieniem obserwowanych zjawisk.

2. Ocena ogólna:

Praca jest przedstawiona w formie monografii, zawierającej wszystkie rozdziały niezbędne w prawidłowym dowodzeniu naukowym.

Praca została zrealizowana w trudnych warunkach zachowania koniecznej równowagi pomiędzy prawem do powszechnej informacji realizowanej poprzez otwarte zasoby naukowe i koniecznej do komercjalizacji zachowaniem tajemnicy producenta. Dlatego, jak rozumiem nie wszystkie informacje są dostępne, szczególnie te dotyczące sposobu uzyskania związków terapeutycznych i ich molekularnych mechanizmów działania. Jednak wykazany postęp wiedzy dotyczącej nowoczesnych terapii komórkowych w leczeniu nowotworów pozwala na uznanie tego osiągnięcia jako podstawy do uzyskania stopnia doktora nauk biologicznych.

Przed publikacją wyników rozprawy niektóre kwestie wymagają uściślenia lub wyjaśnienia:

- w części metodycznej niezbędne jest przedstawienie sposobu bramkowania komórek barwieniu wielokolorowym przy użyciu techniki cytometrii przepływowej. Nie jest jasne jak były barwione komórki, dla których wartości intensywności fluorescencji przedstawione są na Rycinie 18. Antygeny powierzchniowe komórek były znakowane przeciwciałami

koniugowanymi z tymi samymi fluorochromami np. CD16 , HLA-DR lub CD163i PDL-1, co wyklucza barwienie wielokolorowe

- w rozdziale założenia i cel pracy brakuje wskazania modelu raka trzustki w badaniach *in vivo*

- w rozdziale 5.1 nie jest jasne źródło pochodzenia PBMC

- w rozdziale 5.5. brakuje kontroli internalizacji ferrytyny przez nie stymulowane makrofagi jako kontroli bez cytokin

- wyniki badań *in vivo* testujące skuteczność terapii są trudne do interpretacji, ponieważ w tym doświadczeniu nie zaplanowano kontroli podaży samych makrofagów nie zawierających leku związanego z ferrytyną. Nie można wykluczyć cytotoksycznego oddziaływania makrofagów podawanych dootrzewnowo niezależnie od cytotoksycznych właściwości leku. Dlatego w mojej ocenie naukowa wartość tego eksperymentu a szczególnie wyjaśnienie potencjalnego mechanizmu obserwowanego zahamowania wzrostu nowotworu mogłaby być wyższa, gdyby uwzględniono zaproponowaną powyżej kontrolę.

- autorce nie udało się uniknąć paru błędów stylu i powtórzeń

Jednocześnie oceniana praca i jej rezultaty są inspirujące do pytań, które pozwolę sobie przedstawić:

1. Jak długo makrofagi będą mogły pozostawać w środowisku guza i czy mogą zmienić/utrwalić swój fenotyp w kierunku M2
2. Jak długo po ostatnim podaniu będą prawdopodobnie mogły pozostawać w wątrobie i innych tkankach?
3. Czy egzosomy mogą brać udział w transferze kompleksów ferrytyna-lek?
4. Czy źródłem makrofagów mogłyby być komórki macierzyste szpiku , co pozwoliłoby uniknąć ich bankowania w formie monocytów/makrofagów?

Wszystkie zawarte w recenzji uwagi krytyczne, pytania i wątpliwości nie umniejszają wartości merytorycznej pracy. Mam nadzieję, że wyjaśnienie ich przez autorkę będzie dla Niej pomocą w opracowaniu pracy do publikacji i dalszym rozwoju kariery naukowej.

3. Podsumowanie:

Przedstawiona do oceny praca Pani mgr. inż. Małgorzaty Górczak jest oryginalnym rozwiązaniem naukowym potwierdzającym założenia koncepcji zdolności makrofagów ludzkich do absorpcji i transferu leków cytotoksycznych w połączeniu z ferrytyną do komórek nowotworowych różnych typów litych nowotworów człowieka. Badania te mogą być silnym wsparciem ewentualnego procesu komercjalizacji tej nowatorskiej terapii.

Rozprawa doktorska Pani mgr inż. Małgorzaty Górczak pt: „Przedkliniczne zastosowanie makrofagów jako nośnika leków do guzów litych” spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018r Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (tj. Dz.U.z 2021r poz.487 ze zm.) i tym samym wnoszę do Rady Dyscypliny Biologii Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego o dopuszczenie pani mgr inż. Małgorzaty Górczak do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Prof. dr hab. Anna Chełmońska-Soyta

