

Warszawa, 29.04.2022 r.

Dr hab. n. med. Elżbieta Sarnowska
Zakład Immunoterapii Eksperymentalnej
Narodowy Instytut Onkologii
im. Marii Skłodowskiej-Curie
– Państwowy Instytut Badawczy
ul. Roentgena 5
02-781 Warszawa

Recenzja pracy doktorskiej pt. „Evaluation of the anticancer efficacy of a chimeric antigen receptor targeting PD-L1 molecule”.

Autorka: mgr Katsiaryna Marhelava

Choroby nowotworowe są jedną z głównych przyczyn zgonów na świecie dlatego są istotnym problemem cywilizacyjnym. Pomimo ogromnych postępów w leczeniu przez zastosowanie terapii celowanych i immunoterapii, wciąż wiele typów nowotworów stanowi wyzwanie dla współczesnej medycyny. Jedną z obecnie stosowanych nowatorskich metod leczenia jest użycie modyfikowanych limfocytów T, które mają za zadanie zlikwidować komórki nowotworowe poprzez swoją aktywność cytotoksyczną. Jest to metoda niezwykle precyzyjna, ale i kosztowna, gdyż modyfikowane są limfocyty T pochodzące od konkretnego pacjenta. W chwili obecnej stosowana jest terapia CAR-T anty-CD19 w leczeniu niektórych typów chłoniaków i białaczek, jednak terapię CAR-T dla guzów litych wciąż są dużym wyzwaniem. Dzieje się tak ze względu na ich charakterystykę, a głównie na dużą heterogenność, brak ekspresji specyficznych antygenów/neoantygenów we wszystkich komórkach guza, dużą masę i słabe ukrwienie a przez to brak dostępu, a także immunosupresyjne mikrośrodowisko guza. Dodatkowo, nie wszystkie guzy są „widoczne”

dla układu odpornościowego, są to tzw. guzy zimne, dlatego strategia użycia CAR-T do guzów litych wydaje się być sensowna, jednak pozostaje wciąż wiele kwestii do rozwiązania, jak np. czy celem powinien być jeden czy więcej antygenów/neoantygenów nowotworowych, itp. W swojej pracy doktorskiej Doktorantka postawiła sobie cel bardzo ambitny i bardzo na czasie, a mianowicie, czy zastosowanie CAR-T anty-PD-L1 może być wykorzystane w leczeniu guzów litych, w tym raka piersi, oraz jakie są „wady i zalety” takiego podejścia.

Przedstawiona praca składa się ze standardowych części - Wstępu, Celów pracy, Materiałów i metod, Wyników, Dyskusji oraz Literatury. Praca poprzedzona jest spisem treści, co ułatwia pracę nad tekstem. Szczególną uwagę zwraca przejrzyste napisany, acz trochę zbyt długi wstęp, który dobrze wyjaśnia podjęte zagadnienia. W kolejnej części cele naukowe są czytelnie przedstawione, aczkolwiek początkowy opis je poprzedzający jest zdecydowanie za długi i bardziej przypomina wstęp. Opis materiałów i metod użytych w pracy doświadczalnej, opracowanie wyników przeprowadzonych doświadczeń oraz obszerna dyskusja i bibliografia są dobrze i zrozumiale napisane i sformułowane. W pracy ponadto znajdują się streszczenia w języku polskim i angielskim a także wykaz skrótów, które są bardzo pomocne podczas czytania pracy. Praca napisana jest w sposób interesujący i zawiera wystarczające informacje, które umożliwiają ocenę dokonań Doktorantki oraz wagę prowadzonych przez nią badań. Zarówno układ pracy jak i ujęte w niej dane literaturowe oraz informacje i oświadczenia spełniają wszelkie wymogi formalne i są zgodne z art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 o stopniach naukowych i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2003 poz. 595 z późniejszymi zmianami) oraz Rozporządzeniem Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dn. 30 października 2015 r., w sprawie szczegółowego trybu i warunków przeprowadzania czynności w przewodzie doktorskim, postępowaniu habilitacyjnym oraz w postępowaniu o nadanie tytułu profesora (Dz.U. 2015, poz. 1842).

W pracy Doktorantka przeanalizowała linie raka piersi pod względem obecności białka PD-L1 na powierzchni komórek nowotworowych. Do dalszych badań wybrała linię z największą ilością PD-L1 – MDA-MB-231 oraz linię bez PD-L1 – MCF7. Dodatkowo, w celu weryfikacji wyników, wyprowadziła linie MDA-MB-231 z wyciszeniem PD-L1 oraz MCF7 z nadekspresją PD-L1, co potwierdziła analizą cytometryczną. Doktorantka zoptymalizowała również proces uzyskiwania stabilnych anty PD-L1 CAR-T za pomocą systemu lentiwirusowego. W dalszej części pracy Doktorantka analizuje status PD-L1 w aktywowanych limfocytach T, oraz w PD-L1 CAR-T, a następnie analizuje zdolności cytotoksyczne PD-L1 CAR-T względem różnych linii komórkowych, które wcześniej przygotowała. Interesujący jest fakt, że PD-L1 CAR-T wykazywały zdolności do unicestwiania komórek MCF7, które mają śladową ilość PD-L1, podobnie jak linii MDA-MB-231 z dużą ilością PD-L1 na powierzchni. Jest to fascynująca obserwacja, którą Doktorantka na podstawie dalszych eksperymentów tłumaczy tym, że PD-L1 CAR-T wyrzucając dużą ilość różnych cytokin (najważniejsze IFN- γ i TNF- α) indukują ekspresję PD-L1 w komórkach MCF7. Czyli jednym słowem uwrażliwiają wcześniej niewrażliwe komórki raka na atak modyfikowanych limfocytów T PD-L1 CAR-T. **W związku z tym, bardzo proszę Doktorantkę o wytłumaczenie, czy jest to proces charakterystyczny dla CAR-T, których celem jest PD-L1, czy jest to cecha charakterystyczna również dla innych CAR-T, niezależna od celu molekularnego?**

W dalszej części pracy Doktorantka badając wpływ PD-L1 CAR-T na komórki nienowotworowe, HMEC, MCF10A i HEK293T, zauważa, że w tych pierwszych zastosowanie PD-L1 CAR-T indukuje ekspresję PD-L1 i eliminuje te komórki, jednak nie w komórkach linii HEK293T, które są odporne. **Jaka może być tego przyczyna? Czy znaczenie może mieć to, że te komórki mają różne pochodzenie oraz że w różny sposób były „unieśmiertelniane”? Proszę Doktorantkę o wyjaśnienie.**

Mechanizm indukcji PD-L1 na komórkach nowotworowych przez naciekające limfocyty T i inne komórki układu odpornościowego jest jedną z dróg ucieczki nowotworu spod kontroli układu odpornościowego. **Jednak w przypadku doświadczeń na linii MCF7 Doktorantka nie zaobserwowała wzrostu PD-L1 po inkubacji z niemodyfikowanymi limfocytami T, tylko z PD-L1 CAR-T; dlaczego?**

Praca napisana jest poprawnym językiem, świadczącym o dojrzałości zawodowej Doktorantki, jakkolwiek nie ustrzegła się ona drobnych literówek. Dodatkowo, w pracy Doktorantka popełniła kilka innych błędów jak np. dopiero w punkcie 4.3.3 Doktorantka wyjaśnia jak ewaluowała ekspresję CAR w limfocytach T, a punkt wcześniej już używa tej metody, bez opisu dlaczego. Dodatkowo, w metodach brak jest opisu metod statystycznych użytych w pracy. Statystyka jest włączona do podpisów do poszczególnych rysunków, jednak dla porządku syntetyczny opis użytych metod statystycznych powinien się również znaleźć w rozdziale Materiały i metody. Na stronie 82 Doktorantka stwierdza, że „PD-L1-CAR-encoding DNA is successfully translated”. Rozumiem, że to skrót myślowy, gdyż ten podrozdział dotyczy transfekcji limfocytów T mRNA PD-L1 CAR-T, a wcześniej Doktorantka robiła transkrypcję *in vitro*. **Proszę doktorantkę o wyjaśnienie tej kwestii.**

Dodatkowo, w moim odczuciu, dyskusja jest zbyt długa i w niektórych przypadkach pozostawiono w tekście numery PMID do publikacji. Doktorantka zbyt szczegółowo opisuje niektóre zagadnienia, które nie są bezpośrednio związane z wynikami, co powoduje brak zogniskowania i utrudnia czytelnikowi śledzenie głównego przekazu pracy. Niektóre fragmenty pasują bardziej do wstępu niż do dyskusji. Jak dla mnie za mało jest solidnego przedyskutowania wyników i próby wytłumaczenia niektórych zaobserwowanych zjawisk, np. indukcji ekspresji PD-L1 w pierwszych dniach po stymulacji limfocytów T. **Czy Doktorantka mogłaby wyjaśnić znaczenie tego zjawiska?**

Podsumowując uważam, że mgr Katsiaryna Marhelava osiągnęła stawiane sobie cele naukowe. Wyniki prac doświadczalnych ujęte w rozprawie umożliwiły wyciągnięcie wniosku, że terapia adoptywna z użyciem anty PD-L1 CAR-T może mieć zastosowanie w klinice w leczeniu guzów litych, jednak wymaga znaczących usprawnień aby była bezpieczna dla pacjenta. Przedstawiona w pracy dyskusja, aczkolwiek zbyt długa, w bardzo dobry sposób naświetla dalsze drogi prowadzenia badań w tej dziedzinie nauki. Dlatego wnioskuję do Rady Dyscypliny Nauk Medycznych WUM o dopuszczenie mgr Katsiaryna Marhelava do dalszych etapów przewodu doktorskiego oraz wnioskuję o wyróżnienie pracy.