

Recenzja rozprawy doktorskiej magister Katsiaryny Marhelavy: „Evaluation of the anticancer efficacy of a chimeric antigen receptor targeting PD-L1 molecule”

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska to praca doświadczalna, której celem było wygenerowanie linii limfocytów T z ekspresją receptora CAR o specyficzności przeciw ligandowi dla receptora PD (PD-L1) i ocena ich aktywności wobec komórek nowotworowych. Realizacja tego celu odbyła się poprzez analizę linii nowotworów raka piersi pod kątem ekspresji PD-L1, optymalizację metody indukcji ekspresji PD-L1 na powierzchni limfocytów T i analizy cytotoksyczności takich limfocytów względem komórek linii nowotworowych z różnym poziomem ekspresji receptora PD-L1 oraz analizy toksyczności limfocytów T z ekspresją PD-L1 względem komórek nienowotworowych. W dłuższej perspektywie, wyniki pracy posłużą przygotowaniu terapii przeciwnowotworowej wykorzystującej adoptywny transfer limfocytów T zmodyfikowanych genetycznie tak, aby dochodziło w nich do ekspresji chimerycznych receptorów antygenowych (CAR) z konstruktem kodującym PD-L1-CAR. Otrzymane wyniki wskazują na zdolność limfocytów PD-L1-CAR-T do specyficznej eliminacji komórek charakteryzujących się obecnością białka PD-L1 na swojej powierzchni. Ponadto, zaobserwowano że limfocyty PD-L1-CAR-T wzmacniają własne działanie poprzez indukcję ekspresji PD-L1 na komórkach, które je otaczają.

Głównym wnioskiem pracy jest potwierdzenie skuteczności opracowanych modyfikowanych limfocytów w eliminacji komórek raka piersi *in vitro*. Otwiera to możliwość dla dalszych badań w kierunku zastosowania tych komórek w terapii, ale należy też pamiętać o względach bezpieczeństwa przy ich potencjalnym stosowaniu *in vivo*.

Praca ma układ klasyczny. Rozpoczyna ją Wstęp, w którym Doktorantka w sposób szczegółowy omawia współczesne metody leczenia nowotworów ze szczególnym uwzględnieniem immunoterapii i leczenia limfocytami CAR-T. Następnie Doktorantka

szczegółowo opisuje rolę receptorów typu inhibitorów punktów kontrolnych (głównie osi PD-1 – PD-L1) oraz implikacji dla progresji i leczenia nowotworu w przypadku modulowania tych receptorów. Rozdział jest napisany w sposób przystępny. Doktorantka używa współczesnej literatury dla poparcia swoich tez. Następnie, opierając się o tezy ze wstępu pracy Doktorantka przedstawia cele pracy.

Kolejnym rozdziałem są Materiały i Metody, w którym Doktorantka przedstawiła szczegółowo stosowaną metodologię. Dobór metod uważam za właściwy do zaproponowanego celu pracy. Użyte techniki są nowoczesne i pozwoliły odpowiedzieć na zadawane w pracy pytania badawcze. Oprócz standardowych technik laboratorium immunologicznego, w szczególności sposób opisana została technologia klonowania konstruktów oraz sposoby transfekcji komórek przy pomocy lentiwirusów oraz elektroporacji. Wreszcie, Autorka opisała analizę ekspresji wprowadzonego receptora CAR. Kolejną częścią pracy są Wyniki. Autorka rozpoczyna od analizy ekspresji ligandu PD-L1 na różnych liniach komórkowych raka piersi, a następnie opisuje próbę stworzenia modelu do oceny aktywności limfocytów T z ekspresją PD-L1. Kolejną częścią pracy jest opis metody tworzenia limfocytów T z ekspresją PD-L1 poprzez elektroporację lub transdukcję lentiwirusową oraz sprawdzenie efektywności tych technik laboratoryjnych dla uzyskania ekspresji PD-L1-CAR-T. Uzyskane zmodyfikowane limfocyty były następnie testowane w obecności komórek linii nowotworowych, szczególnie z wyłączonym genem *pd-l1* i z jego nadekspresją, gdzie wykazano cytotoksyczność względem guza. Szczególnym odkryciem pracy jest skuteczność modyfikowanych komórek wobec guza z wyłączoną ekspresją PD-L1, co Autorka wiąże z prozapalnym środowiskiem implikowanym przez cytokiny wydzielane przez te limfocyty. Szczególnie ważna dla przyszłego zastosowania modyfikowanych limfocytów jest natomiast toksyczność względem komórek nienowotworowych.

Kolejnymi rozdziałami są Dyskusja i Wnioski, w których Autorka w sposób przekonujący zinterpretowała uzyskane wyniki. Użyta literatura podobnie jak we Wstępie jest adekwatna i w pełni popiera wnioski wysnute przez Doktorantkę.

Układ doświadczeń w pracy jest bardzo logiczny, wnioski są poparte uzyskanymi wynikami. Nie znalazłem istotnych pomyłek lub błędów. Uważam pracę za bardzo pożyteczną, w szczególności jej potencjalny praktyczny aspekt jako część rozwojowego projektu, który może doprowadzić do skutecznej metody leczenia nowotworów. Na uwagę

zasługuje także szeroki wachlarz przeprowadzonych badań i zapewne bardzo duży wkład pracy Autorki w przeprowadzenie tych eksperymentów.

Stwierdzam, że rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 roku Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce (Dz.U. 2021 poz. 478, 619, 1630) i wnioskuję o dopuszczenie magister Katsiaryny Marhelavy do dalszych części przewodu doktorskiego.

Jednocześnie zwracam się do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauk Medycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego o wyróżnienie pracy ze względu na jej wartości praktyczne oraz fakt, iż wyniki zostały już częściowo opublikowane w dobrym piśmie międzynarodowym. Uzyskane wyniki pozwalają na dalszy rozwój tego pomysłu do badań klinicznych włącznie. Immunoterapia z użyciem receptorów chimerycznych to obecnie jeden z nowocześniejszych sposobów leczenia w onkologii. Zaawansowanie prac nad taką terapią w zespole Doktorantki budzi mój szczerzy podziw i mam nadzieję, że następna praca będzie już być może raportem z pozytywnie zakończonego badania klinicznego z opracowanym przez Doktorantkę produktem komórkowym. To przykład translacyjnego podejścia jakiego powinniśmy sobie życzyć w każdej pracy doktorskiej z dziedziny nauk medycznych.

K I E R O W N I K

Katedry i Zakładu Immunologii Medycznej
Gdański Uniwersytet Medyczny

prof. dr hab. med. Piotr Trzonkowski