



Gdańsk, 07.06.2014

Dr hab. n. med. Ewa Bień
Katedra i Klinika Pediatrii, Hematologii i Onkologii
Gdański Uniwersytet Medyczny
ul. M. Skłodowskiej-Curie 3a, 80-210 Gdańsk

OCENA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

lek. Moniki Mielcarek

pt.: „Porównanie metod ekspansji komórek CIK (cytokine-induced killer cells) w aspekcie immunoterapii po transplantacji hematopoetycznych komórek macierzystych u dzieci.”

Transplantacja hematopoetycznych komórek macierzystych jest uznaną metodą leczenia nowotworów dziecięcych opornych na standardową chemioterapię i radioterapię. Poza możliwością zastosowania wysokodawkowanej chemioterapii, mającej na celu przełamanie oporności resztkowych komórek nowotworowych, w przypadku transplantacji allogenicznych (allo-HSCT) dodatkowym korzystnym efektem terapeutycznym jest immunologiczna reakcja przeszczep przeciwko nowotworowi. O znaczeniu tego efektu świadczy fakt, iż ryzyko nawrotu choroby nowotworowej po allo-HSCT jest znacząco wyższe u pacjentów, u których nie wystąpiły objawy choroby przeszczep przeciwko gospodarzowi (*Graft versus host Disease*, GvHD). Zrozumiałe są więc próby wzmocnienia lub wywołania immunologicznego efektu przeszczep przeciwko nowotworowi u pacjentów po allo-HSCT. Jedną z metod stosowanych w przypadku pojawienia się lub narastania autologicznego chimeryzmu biorecy są dożylnie infuzje limfocytów dawcy (*donor lymphocyte infusion*, DLI), jednak procedura ta obarczona jest zagrażającym życiu biorecy powikłaniem w postaci rozwoju GvHD. Nie ustają więc poszukiwania nowych,

stosowanych w przypadku pojawienia się lub narastania autologicznego chimeryzmu biorcy są dożylne infuzje limfocytów dawcy (*donor lymphocyte infusion*, DLI), jednak procedura ta obarczona jest zagrażającym życiu biorcy powikłaniem w postaci rozwoju GvHD. Nie ustają więc poszukiwania nowych, bezpieczniejszych metod immunoterapii adoptywnej u dzieci po allo-HSCT, mogących wzmoczyć korzystny efekt przeszczep przeciwko nowotworowi bez nasilania reakcji GvHD i związanych z nią powikłań narządowych.

W tym kontekście badania podjęte przez lek. Monikę Mielcarek są nowatorskie i istotne, zarówno z punktu widzenia poznawczego, jak i klinicznego. Podjęta w nich próba optymalizacji metod immunoterapii z zastosowaniem komórek CIK (*cytokine-induced killer cells*) po allogenicznej transplantacji komórek hematopoetycznych może stać się alternatywą dla wlewu limfocytów dawcy u pacjentów bez objawów choroby przeszczep przeciwko gospodarzowi, a co za tym idzie, przyczynić się do poprawy rokowania u pacjentów zagrożonych wznową nowotworu po allo-HSCT.

Przedłożona mi do recenzji praca pt: „Porównanie metod ekspansji komórek CIK (*cytokine-induced killer cells*) w aspekcie immunoterapii po transplantacji hematopoetycznych komórek macierzystych u dzieci” liczy 129 stron i posiada typowy dla tego typu rozpraw układ. Składa się ze spisu treści oraz rozdziałów zatytułowanych: *Spis używanych skrótów*, *Wstęp*, *Cel pracy*, *Materiały i metody*, *Wyniki*, *Dyskusja oraz Wnioski*. W dalszej kolejności w pracy zamieszczono: streszczenie w języku polskim i angielskim, spis piśmiennictwa, rycin, tabel oraz Aneks I, zawierający projekt badania klinicznego zastosowania infuzji stymulowanych *ex vivo* komórek CIK dawcy u pacjentów obarczonych wysokim ryzykiem nawrotu nowotworu po allogenicznej transplantacji krwiotwórczych komórek macierzystych.

Spis treści jest szczegółowy i bardzo przejrzysty, co ułatwia czytanie pracy. Zamieszczenie spisu rycin i tabel nadaje rozprawie jeszcze większą przejrzystość. Dodatkowym atutem jest streszczenie pracy w języku angielskim, umożliwiające obcojęzycznym studentom uczelni medycznych zapoznanie się z tematem, podstawowymi тезami i wynikami rozprawy.

Wstęp rozprawy jest obszerny, podzielony logicznie na podrozdziały, co zwiększa czytelność przedstawianych zagadnień. Doktorantka w sposób bardzo szczegółowy i wyczerpujący, w oparciu o najnowsze światowe publikacje, omawia w nim problematykę terapii wznów nowotworów dziecięcych po transplantacji komórek hematopoetycznych oraz przedstawia mechanizmy działania dostępnych metod immunoterapii adoptywnej. Zasadniczą częścią wstępu jest omówienie teoretycznych i praktycznych podstaw różnych metod

ekspansji komórek CIK, jak również możliwości ich zastosowania w praktyce klinicznej jako alternatywy dla dotychczas stosowanych infuzji limfocytów dawcy. Doktorantka bardzo słusznie zdecydowała o przeniesieniu części omawianych we *Wstępie* zagadnień z głównego tekstu do tabel (Tabele 1-7), co zwiększyło przejrzystość i logiczny układ prezentowanych wiadomości.

Wszechstronny, szczegółowy i bardzo dobrze udokumentowany *Wstęp* konsekwentnie prowadzi czytelnika do celów pracy i dobrze je uzasadnia. Cele zostały sformułowane jasno i logicznie i obejmują: analizę możliwości wzmocnienia cytotoksyczności przy minimalizacji alloreaktywności komórek CIK poprzez modyfikację protokołu ich hodowli, analizę fenotypu komórek CIK oraz ocenę możliwości ekspansji komórek CIK na potrzeby immunoterapii adoptywnej po allo-HSCT u dzieci wraz z oceną bezpieczeństwa terapii.

Warto wspomnieć, iż projekt został zrealizowany w ramach grantu badawczego przyznanego przez Narodowe Centrum Nauki (nr rejestracyjny N N407 686940, nr umowy 6869/B/P01/2011/40), a na prowadzenie badań *in vitro* uzyskano zgodę lokalnej Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym we Wrocławiu (nr zgody KB – 230/2010).

Należy wyraźnie podkreślić i docenić fakt, że podjęte przez Doktorantkę badania są nowatorskie i jako pierwsze na świecie oceniają i porównują wyniki kilku metod hodowli komórek CIK w jednorodnym układzie eksperymentalnym. W pracy wyprowadzono 54 hodowle komórek CIK, pozyskanych od 16 dawców krwiotwórczych komórek macierzystych, które prowadzono przez 21-28 dni. Komórki poddano ekspansji *ex vivo* z użyciem czterech różnych zestawów cytokin aktywujących. W ściśle ustalonych punktach czasowych hodowli badano gęstość komórkową, żywotność, immunofenotyp, efektywność ekspansji, cytotoksyczność (w stosunku do komórek linii nowotworowej K562 i świeżo wyizolowanych blastów białaczkowych) oraz alloreaktywność (z komórkami macierzystymi i mononuklearnymi z krwi obwodowej) komórek CIK.

Dobór metod badawczych jest prawidłowy i adekwatny do postawionych celów. Ich szczegółowy opis zamieszczony w rozdziale Materiały i Metody ma zrozumiałą i przystępną formę i świadczy o bardzo dobrym teoretycznym, laboratoryjnym i praktycznym przygotowaniu Doktorantki. Liczne tabele, rysunki i schematy wzbogacają pracę nie tylko graficznie, ale przede wszystkim ułatwiają zrozumienie nawet najbardziej skomplikowanych założeń badawczych. Warto podkreślić dbałość Doktorantki o prowadzenie badań zgodnie z zasadami dobrej praktyki klinicznej (GCP), laboratoryjnej (GLP), higienicznej (GHP) oraz dobrej praktyki wytwarzania (GMP) i przechowywania

(GSP). Z treści pracy wynika, że Doktorantka korzystała z nowoczesnych i prawidłowo dobranych metod statystycznych.

Uzyskane przez lek. Monikę Mielcarek wyniki badań zostały przedstawione opisowo oraz w formie licznych przejrzystych tabel i kolorowych rycin. Kolejność wyników jest jasna i logiczna i stanowi odpowiedź na założenia pracy. Doktorantka dowiodła, iż protokół ekspansji komórek CIK z Tymoglobuliną pozwala na zwiększenie ich potencjału cytotoksycznego bez eskalacji alloreaktywności, przez co wykazuje w tym względzie wyższość nad pozostałymi badanymi w pracy protokołami ekspansji komórek CIK. Co więcej, Doktorantka wykazała, iż ekspansja komórek CIK z wykorzystaniem Tymoglobuliny, Imukinu, Proleukiny i medium AIMV wzbogaconego albuminą ludzką umożliwia wyprodukowanie preparatu, który może być zastosowany w praktyce klinicznej, zgodnie z GMP.

Dzięki nowatorskim badaniom lek. Moniki Mielcarek, możliwe stało się pierwsze na świecie zastosowanie wlewu haploidentycznych komórek CIK aktywowanych Tymoglobuliną u dziecka z progresją ostrej białaczki mieloblastycznej, u którego wykorzystano już wszystkie dostępne opcje terapeutyczne. Na przeprowadzenie terapii z wykorzystaniem komórek CIK Doktorantka uzyskała w roku 2013 odrębną zgodę Komisji Bioetycznej UM we Wrocławiu (KB – 176/2013). W wyniku powtarzanych infuzji komórek CIK uzyskano krótkotrwały klirens blastów z poprawą chimeryzmu allogenicznego na obwodzie, co Doktorantka bardzo przekonująco i czytelnie przedstawiła na wykresach (ryciny 60 i 62). Warto podkreślić, iż w czasie czteromiesięcznej obserwacji nie zanotowano żadnych niepożądanych objawów terapii.

W *Dyskusji* Doktorantka analizuje wyniki uzyskanych badań, konfrontując je z wnioskami innych badaczy zajmujących się podobnymi zagadnieniami. Należy podkreślić umiejętność korzystania przez lek. Monikę Mielcarek z piśmiennictwa naukowego oraz jej duże przygotowanie teoretyczne i praktyczne w zakresie badanych zagadnień. Doktorantka stara się nie tylko zinterpretować uzyskane wyniki, ale również wyjaśnić przyczyny zaobserwowanych zjawisk i przedstawić możliwości ich wykorzystania w praktyce klinicznej. Ten ostatni aspekt Doktorantka zresztą realizuje w ramach dysertacji, podejmując opisaną powyżej próbę innowacyjnej terapii komórkami CIK dziecka z oporną na leczenie ostrą białaczką szpikową po allo-HSCT. Zarówno część doświadczalna, jak i kliniczna pracy świadczą o naukowej rzetelności i dojrzałości Doktorantki.

Na podstawie uzyskanych wyników i ich konfrontacji z doświadczeniami innych autorów, Doktorantka sformułowała prawidłowe wnioski, wykazując, że aktywacja komórek CIK Tymoglobuliną generuje korzystne zmiany fenotypowe i

powoduje wyższą ich cytotoksyczność bez eskalacji alloreaktywności. Kluczowym i cennym wnioskiem doktorantki jest stwierdzenie, że infuzje komórek CIK mogą mieć wyższą skuteczność i bezpieczeństwo od DLI, co daje podstawy do podjęcia badań klinicznych klasy I.

Cytowane przez Doktorantkę piśmiennictwo obejmuje 185 pozycji, głównie anglojęzycznych i opublikowanych w okresie ostatnich kilku lat. Co istotne, wśród prac znajdują się trzy publikacje z macierzystego ośrodka Doktorantki, autorstwa Promotora pracy, co świadczy o wspólnych zainteresowaniach badawczych i ciągłości współpracy naukowej.

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska lek. Moniki Mielcarek jest niewątpliwie pracą nowatorską, o wysokiej wartości merytorycznej. Jednak z obowiązku recenzenta muszę zwrócić uwagę na kilka niedociągnięć, głównie redakcyjnych i stylistycznych. I tak:

- pewnym mankamentem rozprawy, widocznym głównie we *Wstępie*, jest stosowanie przez Doktorantkę długich, wielokrotnie złożonych zdań oraz zbyt rzadkie używanie skrótów, wyjaśnionych wcześniej w obszernym rozdziale 2.
- nie wszystkie skróty użyte w tabelach zostały wyjaśnione w spisie skrótów na początku pracy (np. tabela 3 – OUN, Tabela 26 – nazwy cytostatyków). Korzystne byłoby zamieszczenie legend pod tabelami z wyjaśnieniem skrótów użytych w poszczególnych tabelach lub uzupełnienie zamieszczonych już legend.
- korzystna byłaby korekta układu graficznego Tabel 1 i 3 oraz powiększenie formatu niektórych rycin – np. 9, 22, 24, 30, 32, 35, 38, 40, 42, co poprawiłoby czytelność danych w nich zawartych.
- Str 56, tabela 13: sugerowałabym zaokrąglenie wartości odsetka kobiet i mężczyzn w grupie dawców komórek hematopoetycznych do równych liczb (56% i 44%, odpowiednio) i podanie wartości 100% dla całej grupy.
- w swojej pracy Autorka nie ustrzegła się pewnej ilości błędów interpunkcyjnych oraz pojedynczych błędów stylistycznych i gramatycznych oraz tzw. literówek. Oto niektóre z nich:
 - Str 7: „Hodgkin Disease” – powinno być Hodgkin’s Lymphoma (HL) lub ewentualnie: Hodgkin’s Disease,
 - Str 9: „badania dowiodły wyższość” – powinno być: „badania dowiodły wyższości”,
 - Str 9: „o mniejszym stadium zaawansowania” – powinno być: „o niższym stadium zaawansowania”,
 - W tabeli 26 sugeruję zamianę słowa „mucositis” na „zapalenie śluzówek jamy ustnej” oraz „6-MP course” na „kurs (lub cykl) z 6-MP”,
 - Str 15: „po przeszczepie” – powinno być: „po przeszczepieniu”,

- Str 16: "...komórek NK i fenotypie CD3+CD56+, które niepodlegające restrykcji MHC" – powinno być: "...komórek NK i fenotypie CD3+CD56+, niepodlegające restrykcji MHC",
- str 40: „blatów białaczkowych” – powinno być: „blastów białaczkowych”,

Przytoczone w recenzji drobne uchybienia redakcyjne i językowe są proste do poprawienia podczas przygotowywania pracy do publikacji w czasopiśmie zagranicznym, do czego zresztą gorąco Doktorantkę zachęcam. W niczym nie obniżają one wielkiej poznawczej i praktycznej wartości pracy, zawierającej wiele nowatorskich wątków i mającej bardzo ważne implikacje kliniczne.

Podsumowując stwierdzam, że przedłożona mi do recenzji rozprawa doktorska lek. Moniki Mielcarek pt.: „Porównanie metod ekspansji komórek CIK (cytokine-induced killer cells) w aspekcie immunoterapii po transplantacji hematopoetycznych komórek macierzystych u dzieci” spełnia wszystkie wymogi określone w art. 13 ust.1 „Ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym”, stawiane rozprawom doktorskim. Mam przyjemność wnioskować do Wysokiej Rady Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu o dopuszczenie lek. Moniki Mielcarek do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Wobec bardzo wysokich walorów rozprawy doktorskiej lek. Moniki Mielcarek, z pełnym przekonaniem i przyjemnością wnioskuję o nagrodzenie pracy.

dr hab. n. med. Ewa Biń
SPECJALISTA CHOROÓB DZIECI
SPECJALISTA HEMATOLOGII
I ONKOLOGII DZIECIĘCEJ
2967799

Ewa Biń

Dr hab. n. med. Ewa Biń
Katedra i Klinika Pediatrii, Hematologii i Onkologii
Gdański Uniwersytet Medyczny
ul. M. Skłodowskiej-Curie 3a, 80-210 Gdańsk