

## **Recenzja**

### **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”**

Allogeniczne przeszczepienie komórek krwiotwórczych jest szeroko stosowaną metodą dającą w wielu przypadkach jedyną szansę wyleczenia. W okresie po transplantacji u części chorych może występować chimeryzm mieszany, wówczas obok rozwijających się przeszczepionych komórek dawcy utrzymują się przetrwałe komórki biorcy, a wśród nich reszkowe komórki nowotworowe, które mogą doprowadzić do wznowy choroby, stanowiącej jedno z głównych powikłań poprzyszczepowych. Dlatego w przypadku wykrycia choroby reszkowej stosuje się immunoterapię wykorzystującą oddziaływanie przeciwnowotworowe komórek dawcy, zmierzające do eliminacji komórek reszkowych i do uzyskania pełnego chimeryzmu dawcy. Standardowa immunoterapia obejmuje odstawienie leczenia immunosupresyjnego i infuzje limfocytów dawcy, co wiąże się jednak z ryzykiem wywołania istotnej klinicznie choroby przeszczep przeciw gospodarzowi (GVHD). Rozdzielenie reakcji przeszczep przeciw białaczce (GVL) od reakcji GVH stanowi od wielu lat wciąż niezrealizowany cel wielu prac.

Dlatego w pełni uzasadnione jest podjęcie przez lek. Monikę Mielcarek badań nad uzyskaniem specjalnie przygotowanych limfocytów dawcy- komórek zabójczych indukowanych cytokinami (CIK), które posiadając właściwości przeciwnowotworowe, byłyby jednocześnie pozbawione alloreaktywności przeciw zdrowym tkankom chorych po przeszczepieniu komórek krwiotwórczych. Projekt został zrealizowany w ramach grantu badawczego przyznanego przez Narodowe Centrum Nauki.

Rozprawa doktorska liczy 129 stron tekstu, zawiera wszystkie niezbędne rozdziały i ma typowy układ. W pracy zamieszczono 28 tabel i 62 ryciny.

Piśmiennictwo liczy 185 pozycji, w ponad 1/3 pochodzących z ostatnich pięciu lat, które są zgodne z tematyką rozprawy i odpowiadają wymogom metodologicznym.

We wstępie opisano szczegółowo podstawy teoretyczne immunoterapii nowotworów ze szczególnym uwzględnieniem komórek CIK. Drobiazgowo opisane zostały metody ich badania i ekspansji. Wstęp zawiera przegląd aktualnej wiedzy związanej z tematyką badań i uzasadnia podjęte w rozprawie badania.

Celem pracy było:

1. Zbadanie ekspansji komórek CIK w różnych wariantach hodowli, połączone z oceną możliwości wzmocnienia ich cytotoksyczności przeciwnowotworowej bez jednoczesnego nasilania alloreaktywności wobec komórek krwi obwodowej i komórek macierzystych szpiku.

2. Analiza fenotypu populacji komórek CIK i określenie możliwych przyczyn wzmocnienia ich potencjału cytotoksycznego.

3. Ocena możliwości wykorzystania komórek CIK w praktyce klinicznej w ramach adoptywnej immunoterapii u dzieci zagrożonych wznową choroby po allogenicznym przeszczepieniu krwiotwórczych komórek macierzystych.

Sposób przeprowadzenia badań jest oryginalny i bardzo ciekawy. Komórki jednojądrzaste wyseparowane z krwi obwodowej 16 dawców krwiotwórczych komórek macierzystych poddawano ekspansji *ex vivo*, stosując 4 różne protokoły hodowli: z użyciem interleukiny-2 wyłącznie lub w połączeniu z interleukiną-12, -21 lub z tymoglobuliną.

Dobór metod badań jest właściwy i odpowiedni do tematyki pracy. Podczas 4.tygodniowego okresu hodowli autorka badała jej gęstość, żywotność oraz stosując nowoczesne badania cytofluorymetryczne zbadła cechy immunofenotypowe wyhodowanych komórek. Oszacowała też efektywność ekspansji komórek uzyskanych przy użyciu różnych protokołów hodowlanych. Wykorzystując oddziaływanie wyhodowanych komórek CIK z komórkami linii nowotworowej K562 i ze świeżo wyizolowanymi komórkami ostrej białaczki limfoblastycznej i ostrej białaczki szpikowej oceniła ich właściwości cytotoksyczne, natomiast wykorzystując komórki macierzyste szpiku i komórki jednojądrzaste krwi obwodowej oceniła ich alloreaktywność.

Analiza statystyczna została właściwie przeprowadzona.

Autorka wykazała, że protokół ekspansji komórek CIK z tymoglobuliną pozwala na zwiększenie ich potencjału cytotoksycznego bez eskalacji

alloreaktywności. Uzyskane w ten sposób komórki odznaczały się wyższą ekspresją receptorów aktywujących, wysoką ekspresją molekuł adhezyjnych, niskim odsetkiem komórek regulatorowych i komórek litycznie nieaktywnych oraz niższą ekspresją stymulującego apoptozę receptora Fas, co faworyzowało ich przeżycie.

Ekspansja komórek CIK z wykorzystaniem dopuszczonych do stosowania u ludzi leków- tymoglobuliny, interferonu gamma (Imukin) i interleukiny-2 (Proleukin) oraz podłoża AIMV wzbogaconego albuminą ludzką pozwoliła na wyprodukowanie komórek CIK w liczbie wystarczającej do zastosowania klinicznego. Dzięki temu po raz pierwszy na świecie w ramach adoptywnej immunoterapii zastosowano klinicznie wlew haploidentycznych komórek CIK aktywowanych tymoglobuliną. Do zabiegu zakwalifikowano dziecko z progresją ostrej białaczki mieloblastycznej, u którego wykorzystano wcześniej wszystkie dostępne opcje terapeutyczne, które okazały się nieskuteczne. Podczas czteromiesięcznej obserwacji nie zanotowano żadnych niepożądanych objawów terapii. Uzyskano przejściową redukcję liczby komórek blastycznych, której towarzyszył również przejściowy wzrost chimeryzmu dawcy.

W dyskusji autorka wykazała wysoką umiejętność korzystania z aktualnego piśmiennictwa i porównania uzyskanych wyników z dotychczasową wiedzą.

Wnioski odpowiadają na zaplanowane cele i opierają się na wynikach istotnych statystycznie. Można je streścić następująco:

1. Protokół ekspansji komórek CIK zmodyfikowaną metodą z tymoglobuliną pozwala na zwiększenie ich potencjału cytotoksycznego bez wzrostu alloreaktywności.

2. Najbardziej cytotoksyczna populacja komórek CIK cechuje się wyższą ekspresją receptorów aktywujących (CD16, CD161, CD314), wysoką ekspresją molekuł adhezyjnych (CD31, CD56), niskim odsetkiem komórek regulatorowych Treg i komórek naiwnych CD4+CD45RA+, niskim odsetkiem uznawanych za litycznie nieaktywne komórek CD3+CD33+ oraz niższą ekspresją stymulującego apoptozę receptora Fas.

3. Ekspansja komórek CIK z wykorzystaniem dopuszczonych do stosowania u ludzi leków i podłoża pozwala na wyprodukowanie wystarczającej ilości efektorów immunologicznych na skalę kliniczną na potrzeby immunoterapii adoptywnej u dzieci z ryzykiem wznowy po allogenicznej transplantacji krwiotwórczych komórek macierzystych, a ich zastosowanie nie wiąże się z wystąpieniem istotnych objawów niepożądanych.

Płynące z pracy wnioski skłaniają do kontynuowania badania w szerszym wymiarze klinicznym, do czego autorka poczyniła już przygotowania, gdyż w aneksie rozprawy zamieściła gotowy projekt badania klinicznego I fazy.

Mam jedynie drobne uwagi redakcyjne, które w żadnym stopniu nie naruszają wysokiej oceny merytorycznej pracy:

- jednolita polska terminologia powinna być stosowana konsekwentnie w całej rozprawie, np. tylko komórki jednojądrzaste a nie użyty kilkakrotnie we wstępie i w wynikach termin mononukleary, podobnie w opisie sprzętu i w wynikach: komory laminarne a nie laminary,

- w Tabeli 4 oraz w rozdziale Materiały 5.2.12 brakuje objaśnienia co oznacza stosunek E:T, dopiero w tekście wyników jest mowa o stosunku komórek efektorowych do docelowych,

- w Tabelach 4, 5 i 6 kolejność cytowanego piśmiennictwa nie jest konsekwentnie zachowana, a w Tabeli 6 pominięto jeden odnośnik. Ponadto w Tabelach nie jest przyjęte podawanie nazw czasopism, w których ukazało się cytowane badanie; tylko autor, rok publikacji i odnośnik numeryczny do spisu publikacji. Dotyczy to Tabel 4, 5, 6 i 7,

- przegląd opublikowanych badań dotyczących wpływu tymoglobuliny na funkcjonowanie komórek CD4+ *in vitro* w zależności od jej dawki, stanowiący uzasadnienie dla wyboru dawki zastosowanej w pracy, powinien być umieszczony we wstępie, a nie w materiałach,

- informacja o tym, że materiał do założenia hodowli komórek CIK pobrano od 16 potencjalnych dawców hematopoetycznych komórek macierzystych, powinna znaleźć się w rozdziale materiał, a nie przy opisie analizy statystycznej,

- określenie „pełna niezgodność w układzie HLA” powinno być uzupełnione informacją jaki zakres HLA był zbadany,

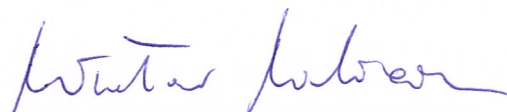
- sposób pisania danych piśmienniczych wymaga korekty: po roku powinien być wolumen (ewentualnie nr zeszytu) i zakres stron; a nie, jak to ma miejsce w wielu pozycjach (np. 3, 6, 7, 9, 13, 16 itd.), pomiędzy rokiem a wolumenem podany jest dzień publikacji.

W podsumowaniu należy podkreślić nowatorski charakter pracy, w której dokonano porównania wyników kilku metod hodowli komórek CIK w jednorodnym

układzie eksperymentalnym. Przedstawione wyniki stanowią unikalną i bardzo cenną obserwację, która została praktycznie wykorzystana do ratunkowego leczenia dziecka z ostrą białaczką szpikową po przeszczepieniu haploidentycznym poprzedzonym trzema przeszczepieniami od dawcy niespokrewnionego, u którego nie było już żadnej innej dostępnej opcji terapeutycznej. Było to zarazem pierwsze na świecie zastosowanie komórek CIK aktywowanych tymoglobuliną u człowieka. Brak objawów ubocznych i uzyskanie przejściowego efektu w bardzo zaawansowanym stadium choroby wskazują na celowość kontynuowania badań jako badań klinicznych adoptywnej immunoterapii u chorych zagrożonych wznową po allogenicznym przeszczepieniu komórek krwiotwórczych.

Na podstawie oceny przedstawionej rozprawy uważam, że rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art.13 ust. 1 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.), to też **wnoszę do Wysokiej Rady Wydziału Lekarskiego Kształcenia Podyplomowego Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu o dopuszczenie lek. Moniki Mielcarek do dalszych etapów przewodu doktorskiego.** Z uwagi na to, że oceniana dysertacja zmierza do rozwiązania bardzo istotnego problemu klinicznego, oraz że w ramach badania dokonano unikalnego w skali światowej zabiegu, **składam wniosek o wyróżnienie rozprawy.**

Katowice, 26.05.2014



Dr hab. n. med. Mirosław Markiewicz