

Warszawa, 03.08.2017

Prof. Włodzimierz Maśliński
Zakład Patofizjologii i Immunologii
Narodowy Instytut Geriatrii, Reumatologii i Rehabilitacji
Spartańska 1
02-637 Warszawa

Ocena

Rozprawy Doktorskiej magister Moniki Anny Grygorowicz zatytułowanej:
„Wpływ lenalidomidu na interakcje regulatorowych limfocytów T z komórkami chłoniaków z komórek B”

Nowotwory wywodzące się z limfocytów B stanowią 3-5 procent wszystkich rozpoznawanych nowotworów, a zachorowalność na nie wzrasta 4-5% rocznie. Pomimo dużego postępu metod leczenia oraz stosowania złożonych protokołów łączących chemioterapię, radioterapię, przeszczepów komórek macierzystych szpiku kostnego oraz immunoterapię z wykorzystaniem przeciwciał monoklonalnych, efekty terapii często nie są skuteczne. Z tych powodów, prowadzone są intensywne badania mające na celu poprawę obecnych terapii oraz możliwości wykorzystania naturalnych mechanizmów przeciwnowotworowych. Ostatnie badania wykazały, że zwiększone proporcje regulatorowych limfocytów T (Treg) naciekających niektóre typy chłoniaków, wykazują korelację z dłuższym czasem przeżycia chorych. Obserwacje te sugerowały, że limfocyty Treg w pewnym stopniu mogą uczestniczyć w kontrolowaniu rozrostu komórek tych nowotworów. Dane te zainspirowały Doktorantkę do postawienia hipotezy, że limfocyty regulatorowe mogą wykazywać właściwości supresyjne hamujące proliferację komórek nowotworowych. Autorka postanowiła sprawdzić tę hipotezę poprzez przeprowadzenie badań oceniających w warunkach in vitro zdolności allogenicznym limfocytów regulatorowych do supresji proliferacji komórek linii chłoniaków wywodzących się z obwodowych limfocytów B oraz możliwości wzmacniania tych efektów w obecności leku przeciwnowotworowego lenalidomidu.

Praca zawiera 140 stron w typowym układzie: Streszczenie (w języku polskim i angielskim), Wstęp, Założenia i cel pracy, Materiały i Metody, Wyniki, Dyskusja, Wnioski, oraz Piśmiennictwo.

We wstępie, Autorka omówiła znane właściwości immunomodulujące lenalidomidu, w tym hamowanie proliferacji komórek nowotworowych wywodzących się z limfocytów B, wzmacnianie efektów efektorowych limfocytów T, zwiększanie efektów cytotoksycznych komórek NK, ale także hamujący wpływ na limfocyty T regulatorowe. Następnie szczegółowo omówiła limfocyty T regulatorowe, w tym ich występowanie, ekspresję charakterystycznego dla nich czynnika transkrypcyjnego FoxP3, obecność markerów fenotypowych. Przedstawiła także złożone mechanizmy wykorzystywane przez komórki Treg do hamowania funkcji limfocytów efektorowych oraz komórek dendrytycznych. W kolejnej części Autorka opisała chłoniaki z obwodowych limfocytów B, ich różnorodność, zależności

ich przeżycia, namnażania od sygnałów pochodzących z mikrośrodowiska, ale także mutacji, które generując wewnątrzkomórkowe sygnały, powodują dużą niezależność niektórych typów chłoniaka od sygnałów zewnętrznych. Przedstawiła także metody leczenia chłoniaków, w tym chemioterapię z zastosowaniem lenalidomidu oraz allogenicznego przeszczepienia komórek krwiotwórczych (all-HCT), z którym jednak może się wiązać występowanie reakcji przeszczep przeciwko gospodarzowi (GvHD). Omówiła również próby wykorzystania limfocytów Treg do hamowania GvHD, które jednak obecnie są jeszcze w fazach eksperymentalnych. W końcowej części Wstępu przedstawiała rolę limfocytów Treg w nowotworach układu chłonnego, podkreślając, że w większości badań, wykazywano korelację pomiędzy podwyższoną liczbą Treg naciekających chłoniaka lub we krwi obwodowej, a lepszym rokowaniem. Jednakże istnieją również badania wskazujące na przeciwną zależność.

Ten wstęp jest dobrym wprowadzeniem do sformułowania założeń i celu pracy, którymi było zbadanie zdolności świeżo wyizolowanych a także namnażanych *in vitro* allogenicznych limfocytów Treg do supresji proliferacji komórek linii chłoniaków wywodzących się z obwodowych limfocytów B, zależności działania regulacyjnego Treg od warunków ich aktywacji oraz określenie wpływu lenalidomidu na aktywację limfocytów Treg i ich oddziaływania regulacyjne w stosunku do badanych linii chłoniaków.

W następnym rozdziale, Materiałach i metodach, Autorka przedstawiła wybrane do badań 11 linii komórkowych nowotworów wywodzących się z obwodowych limfocytów B, reprezentujących sześć typów chłoniaków: chłoniak grudkowy, chłoniak rozlany z dużych komórek B, chłoniak z komórek płaszczka, szpiczak plazmocytowy, chłoniak Burkitta oraz chłoniak Hodgkina. Kolejno dokładnie opisała zastosowane metody, w tym wyodrębnianie limfocytów T CD4+CD25+ Treg, i konwencjonalnych limfocytów T CD4+CD25- (Tcon) z krwi obwodowej, generowanie komórek dendrytycznych z monocytów krwi obwodowej, namnażanie limfocytów T, znakowanie komórek barwnikami fluorescencyjnymi, mieszane hodowle leukocytarne bezpośrednie oraz z przedzieleniem błoną półprzepuszczalną, ocena odpowiedzi proliferacyjnej limfocytów Treg, wykrywanie cytokin w hodowlach mieszanych, analiza statusu metylacji DNA genu FOXP3, określanie fenotypu limfocytów T, oraz obserwacja przyżyciowa hodowli mieszanych. Wybór tak wielu, często skomplikowanych technicznie metod był spowodowany szerokim zakresem zaplanowanych badań. Jednocześnie, ich zastosowanie było wystarczające do osiągnięcia zaplanowanych celów.

Do analizy statystycznej otrzymanych wyników zastosowano odpowiednie testy statystyczne.

W kolejnym rozdziale, Wynikach, Autorka przedstawiła otrzymane wyniki. Spośród bardzo wielu zaprezentowanych wyników za najważniejsze uważam:

- opracowanie metody bardzo efektywnego namnażania funkcjonalnych limfocytów regulatorowych Treg w warunkach *in vitro*, oraz stwierdzenie lepszych efektów supresyjnych tych komórek, kiedy ich namnażanie było prowadzone w obecności rapamycyny i niskich stężeń IL-2.
- wykazanie zdolności namnożonych limfocytów regulatorowych do hamowania proliferacji komórek chłoniaków wywodzących się z obwodowych limfocytów B. Spośród 11 zbadanych linii komórkowej tylko jedna (REC-1) nie ulegała supresyjnemu działaniu Treg.
- wykazanie, że świeżo wyizolowane limfocyty Treg hamowały proliferację większości badanych linii chłoniaka, chociaż w niektórych przypadkach wspomagały proliferację

komórek chłoniaka. Wyniki te wskazują na większą przydatność stosowania namnożonych w warunkach in vitro limfocytów Treg do hamowania proliferacji komórek chłoniaka.

- wykazanie, że za efekty supresorowe limfocytów Treg są odpowiedzialne zarówno czynniki rozpuszczalne produkowane przez limfocyty Treg, jak i bezpośredni kontakt tych limfocytów z komórkami chłoniaka. Jednakże, w przypadku bezpośredniego kontaktu z komórkami chłoniaka, hamowanie ich proliferacji było silniejsze.

- wykazanie, że namnożone w warunkach in vitro limfocyty Treg wydzielają IL-10 i IFN- γ , które częściowo mogą być odpowiedzialne za efekty supresyjne.

- wykazanie potęgowania supresyjnego działania limfocytów Treg na badane komórki chłoniaka przez lenalidomid, pomimo hamowania proliferacji limfocytów Treg.

Otrzymane wyniki wskazują na potencjalne możliwości zastosowania namnożonych w warunkach in vitro w obecności rapamycyny limfocytów regulatorowych w celu supresji przetrwałych komórek chłoniaka po przeszczepieniu allogenicznym komórek krwiotwórczych. Dodatkowo, zastosowanie komórek regulatorowych może równocześnie przeciwdziałać powstawaniu reakcji przeszczep przeciw gospodarzowi po przeszczepie komórek allogenicznych.

Wyniki także wskazują na możliwości zastosowania komórek regulatorowych w połączeniu z lenalidomidem w celu hamowania wznowy chłoniaka po autologicznym przeszczepieniu autologicznym komórek krwiotwórczych u chorych, u których chłoniak jest wrażliwy na działanie limfocytów Treg i przeciwnowotworowe działanie lenalidomidu.

W kolejnej części pracy, Dyskusji, Autorka szczegółowo ustosunkowała się do uzyskanych wyników na tle dostępnej literatury światowej. W przypadkach uzyskania przez nią odmiennych wyników, wskazała na różnice metodyczne wykonania doświadczeń i w sposób przekonywujący podkreślała zalety jej bardziej kompleksowego rozwiązania.

Przedstawiła możliwe mechanizmy odpowiedzialne za obserwowane efekty hamowania proliferacji komórek chłoniaka i omówiła je na tle danych literaturowych. W dużej części, wydaje się, że występuje szereg mechanizmów, które wykorzystują zarówno bezpośredni kontakt Treg z komórkami chłoniaka, jak i rozpuszczalne czynniki hamujące ich proliferację. Wyniki otrzymane przez Autorkę wskazują na niewielki udział granzymu A w zabijaniu komórek chłoniaka, chociaż komórki Treg wykazują jego ekspresję.

Omówiła także metody namnażania limfocytów regulatorowych zarówno zastosowanych w ocenianej pracy, jak i w literaturze. Podkreśla pewne istotne różnice, które mogą powodować, że zastosowana przez nią metoda namnażania limfocytów Treg prowadząca do zachowania funkcji supresyjnych, może być zaletą obecnej pracy w porównaniu do prac innych autorów.

Autorka wykazała się dużą znajomością literatury a dyskusja jest przeprowadzona w sposób profesjonalny.

W następnej części rozprawy, Wnioskach Autorka przedstawiła 6 wniosków, z których 4 bardzo dobrze odzwierciedlają uzyskane wyniki, a kolejne 2 sugerują możliwości wykorzystania namnożonych limfocytów regulatorowych w uzupełniającej terapii chłoniaków po przeszczepieniu allogenicznych lub autologicznych komórek krwiotwórczych.

Całość pracy, pomimo bardzo wielu kierunków badań, i otrzymania wielu wyników przedstawionych na 45 Rycinach, jest napisana w sposób jasny. Recenzent zgadza się z

wnioskami wyciągniętymi przez Autorkę, i ma nadzieję, że wyniki te będą stanowiły podstawę do rozważenia dalszych etapów badań nad wprowadzeniem przeszczepów namnażanych w warunkach in vitro komórek regulatorowych do terapii chłoniaków wywodzących się z obwodowych limfocytów B.

Biorąc pod uwagę powyższe, mam przyjemność stwierdzić, że praca odpowiada wymogom stawianym pracom doktorskim i dlatego przedstawiam Przewodniczącemu Komisji ds. Doktorskich i Wysokiej Radzie Centrum Onkologii-Instytutu, im. Marii Skłodowskiej-Curie wniosek o dopuszczenie magister Moniki Grygorowicz do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Równocześnie, biorąc pod uwagę całość pracy oraz wynikające z niej wnioski, recenzent występuje z wnioskiem o jej wyróżnienie.

Prof. dr hab. Włodzimierz Maśliński

KIEROWNIK
KATEDRY PATOFIZJOLOGII I IMMUNOLOGII
Narodowy Instytut Geriatrii,
Reumatologii i Rehabilitacji w Warszawie



prof. dr hab. Włodzimierz Maśliński