

Prof. dr hab. Arkadiusz Miązek  
Zakład Immunologii Nowotworów  
Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN  
im. Ludwika Hirszfelda we Wrocławiu

Wrocław, 2021-07-15

### Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr inż. Martyny Marii Mianowskiej pt. „Opracowanie liposomowych formułacji wybranych substancji w celu otrzymania skutecznej immunoterapii nowotworu jelita grubego” zrealizowanej w Zakładzie Lipidów i Liposomów pod kierunkiem profesora Jerzego Gubernatora

#### 1. Ocena formalna:

Podstawą wykonania niniejszej recenzji jest uchwała nr 55/2021 Rady Dyscypliny Naukowej Nauki Biologiczne Uniwersytetu Wrocławskiego we Wrocławiu z dnia 22 kwietnia 2021 roku. Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska składa się z 210 stron maszynopisu w formie wydruku komputerowego w oprawie twardej podzielonego na następujące części: spis treści (s.4-8), streszczenie (s.9-11), streszczenie w języku angielskim (summary) (s. 12-14), wykaz stosowanych skrótów i symboli (s.15-23), wstęp (s.24-77), cel pracy doktorskiej (s.78-79), materiały i metody (s.80-101), wyniki (s.102-174), dyskusja (s.175-190), podsumowanie (s.191-192), spis rysunków (s. 193-196), spis tabel (s.197), bibliografia (s.198-210). Dodatkowo na stronie 3, przed spisem treści zamieszczono informację, że praca doktorska była współfinansowana z grantu Narodowego Centrum Nauki, Preludium (2019/33/N/NZ5/02758) którym kierowała Doktorantka. Układ rozprawy, proporcje pomiędzy rozdziałami oraz ich kolejność są typowe dla monografii naukowej. Praca napisana jest staranną polszczyzną. Autorka swobodnie posługuje się specjalistycznym słownictwem naukowym. Warto podkreślić bardzo dobrą edycję tekstu rozprawy (w tekście rozprawy nie dostrzegłem literówek) oraz przejrzystą i pomocną w zrozumieniu opisywanych problemów oprawę graficzną. W 6 tabelach i na 105 rysunkach zestawiono informacje istotne dla lepszego zrozumienia przedmiotu pracy, zastosowanych materiałów i metod oraz wyników doświadczeń. Układ graficzny rysunków prezentujących wyniki badań jest spójny pomiędzy eksperymentami co ułatwia ich analizę. Opisy rysunków przedstawiających dane eksperymentalne są przejrzyste i jednoznaczne, a dołączona analiza istotności statystycznej ułatwia ich ocenę. Bibliografia, zawiera 180 odniesień do aktualnej literatury fachowej, w większości publikowanej w XXI wieku. Dobór cytowanej literatury nie budzi zastrzeżeń, świadczy o dobrej orientacji Autorki w aktualnym piśmiennictwie. Podsumowując ocenę strony formalnej stwierdzam, że niniejsza rozprawa spełnia wszystkie kryteria zwyczajowo przyjęte dla tego typu opracowań i świadczy o dobrym opanowaniu przez Autorkę sztuki pisania tekstów naukowych i prezentacji wyników badań w języku polskim.

## 2. Ocena merytoryczna:

Tematem niniejszej rozprawy jest opracowanie i zbadanie właściwości fizycznych i biologicznych oryginalnych formułacji liposomowych zawierających berberynę bądź imikwimod w kontekście ich wykorzystania jako nośników w immunoterapii nowotworów jelita grubego. Aktualne dane epidemiologiczne dotyczące powyższego typu nowotworu<sup>1</sup> jak i ogólnie nie w pełni satysfakcjonujące efekty leczenia guzów litych opartego na blokadzie punktów kontrolnych adaptacyjnego układu odpornościowego, skłaniają do poszukiwania alternatywnych metod immunoterapii<sup>2</sup>. W tym kontekście warto przywołać profetyczne słowa lekarza, Sir Bloomfield'a Bonington'a, fikcyjnej postaci ze sztuki George'a Bernard'a Shaw'a z roku 1906 pt. „Lekarz na rozdrożu”<sup>3</sup>, w której czytamy: „-*Jest w gruncie rzeczy tylko jeden prawdziwie naukowy sposób na leczenie wszystkich chorób, jest nim pobudzenie fagocytów*”<sup>4</sup> Być może inspiracją Shaw'a dla napisania tego zdania były cytowane przez Doktorantkę na s.30 przełomowe prace Metchnikoffa z końca XIX wieku o fagocytozie jako zakonserwowanym ewolucyjnie mechanizmie eliminacji z organizmu ciał niepożądanych, albo równie spektakularne i pochodzące z tej samej epoki wyleczenia nieoperacyjnych mięsaków i raków przez Williama Coley'a („ojca immunoterapii”) szczepionkami pobudzającymi aktywność żerną makrofagów<sup>5</sup>, wzmiankowane na s. 44 niniejszej pracy doktorskiej. W każdym razie, po upływie ponad stu lat od tamtych wydarzeń coraz większa świadomość roli komórek wrodzonego układu odporności w środowisku guza skłania obecnie do intensywnych poszukiwań sposobów ich pobudzenia w celu eliminacji komórek nowotworowych. Odkrycie szlaku przekazywania sygnałów anty-fagocytarnych CD47-SIRP $\alpha$  pod koniec pierwszej dekady XXI wieku (wzmiankowane na s. 46) lub fagocytozy zależnej od receptorów *Toll*-podobnych (opisanej na s. 47) było zacznym dla testowania nowych strategii immunoterapii opartych na stymulacji fagocytów lekami biologicznymi, małowzrasteczkowymi lub ich kombinacjami. Niniejsza praca doktorska z jednej strony wpisuje się w nurt badań nad skuteczną immunoterapią guzów litych, z drugiej zaś łączy immunoterapię z chemioterapią korzystając z unikalnych właściwości znanej w tradycyjnej medycynie chińskiej oraz indyjskiej (ajurwedzie) berberynie - naturalnie występującego alkaloidu izochinolinowego oraz imikwimodu, analogu nukleozydów wiążącego się z receptorem TLR7 stymulatora fagocytozy makrofagów, odkrytego w latach 80-tych XX wieku i dopuszczonego do stosowania w leczeniu zmian skórnych spowodowanych między innymi wirusem brodawczaka. Uważam, że wybór tematyki rozprawy jest w pełni uzasadniony i wpisuje się w aktualny nurt badawczy immunoterapii nowotworów.

---

<sup>1</sup> Gut. 2019 Oct; 68(10): 1820–1826. Published online 2019 May 16. doi: 10.1136/gutjnl-2018-317592

<sup>2</sup> Nature Reviews Cancer 2019 <https://doi.org/10.1038/s41568-019-0183-z>

<sup>3</sup> Shaw GB. The doctor's dilemma, getting married, and the shewing-up of Blanco Posnet. London: Constable and Co, 1947:102.

<sup>4</sup> Tekst oryginału: “There is at bottom only one genuinely scientific treatment for all diseases, and that is to stimulate the phagocytes”

<sup>5</sup> Postgrad Med J 2003;79:672–680

W pięciu podrozdziałach wstępu przedstawiono pomocny w zrozumieniu problematyki badawczej przegląd literatury, obejmujący między innymi zagadnienia związane z podziałem, epidemiologią i leczeniem nowotworów jelita grubego; interakcjami pomiędzy komórkami układu odporności wrodzonej i nabytej, a komórkami nowotworowymi w obrębie guza; historycznymi i aktualnymi strategiami immunoterapii nowotworów; technologiami wytwarzania, podziału i oceny właściwości fizycznych i biologicznych liposomów w kontekście ich użycia jako nośników substancji biologicznie czynnych. Całość wstępu jest klarowna, a wywód w sposób bardzo sugestywny koncentruje uwagę czytelnika na zagadnieniach opisywanych w części wynikowej pracy. Nie sposób nie docenić oprawy graficznej wstępu. Jakość rysunków poglądowych nie odbiega od profesjonalnych opracowań książkowych. Podpisy pod rysunkami także bardzo dobrze uzupełniają zawarte w nich informacje. W tej części pracy zauważyłem tylko pojedyncze kalki z języka angielskiego np. na str. 29: „główny kompleks zgodności tkankowej” powinien być tłumaczony jako „główny układ zgodności tkankowej”, a zdanie ze strony 39: „komórki nowotworowe wywodzą się z prawidłowych komórek różniąc się kilkoma antygenami” jest w kontekście tego opracowania nieco zbyt kolokwialne. Te drobne uchybienia nie zmieniają jednak ogólnego odczucia zaangażowania Doktorantki w dogłębne przestudiowanie literatury dotyczącej przedmiotu rozprawy i zaprezentowanie jej czytelnikowi w sposób ciekawy i przystępny. Jak inaczej ocenić na przykład zdanie opisujące odkrycie fagocytozy ze strony 30. Autorka pisze: „*Jest to wieloetapowy proces odkryty w 1882 roku przez E. Metchnikoffa, który zauważył, że specyficzne komórki larw rozgwieżdżone wchłonęły włożone w nie ciernie z drzewa mandarynkowego*”. To właśnie to drzewo mandarynkowe, które nie zaistniałoby w dziesiątkach innych rozpraw doktorskich, będąc postrzegane jako nieistotne, w mojej opinii świadczy o nietuzinkowym stosunku Doktorantki do pracy badawczej.

Główny cel pracy doktorskiej oraz cele szczegółowe są moim zdaniem jasno sprecyzowane i uzasadnione. Wyszczególniono trzy modele immunoterapii oparte na hodowli linii komórkowych *in vitro*. Dwa z tych modeli były przydatne do sprawdzenia bezpośredniej aktywności cytotoksycznej formacji liposomowych berberyny oraz jej wpływu na aktywność żerną makrofagów linii THP-1, natomiast trzeci model posłużył do stymulacji aktywności żernej tejże linii aktywowanych makrofagów przez formację liposomową imikwimodu.

W rozdziale „materiały i metody” bardzo szczegółowo potraktowano opis metod badawczych wykorzystywanych w pracy. Na podkreślenie zasługuje różnorodność użytych technik laboratoryjnych. Doktorantka opanowała między innymi metodykę przygotowania liposomów, zamykania w nich substancji czynnych i charakterystyki różnorodnych ich cech fizycznych (np. metodą mikroskopii krioelektronowej) i biologicznych. W pracy udokumentowano także metodykę badań biochemicznych na modelach komórkowych (np. oznaczanie reaktywnych form tlenu, wewnątrzkomórkowego stężenia zredukowanego glutationu, wewnątrzkomórkowego stężenia ATP, stężenia jonów Ca<sup>2+</sup>, aktywności kaspaz) oraz cytometrycznych (ocena żywotności komórek metodą SRB, fluorometryczna metoda

oceny fagocytozy). Komentarza wymaga fluorymetryczna metoda oceny fagocytozy komórek nowotworowych przez makrofagi linii THP-1 opisana na stronach 97-100. Czy ta metoda pozwala na rozróżnienie pomiędzy komórkami nowotworowymi wchłoniętymi przez makrofagi, a takimi które tylko przyłączyły się do zewnętrznej błony komórkowej makrofagów i nie uległy fagocytozie? Jak stabilny jest zastosowany barwnik CFSE po wchłonięciu znakowanych nim komórek nowotworowych przez makrofagi? Podsumowując ocenę tej części rozprawy chciałbym podkreślić, że zaplanowane eksperymenty oraz przeprowadzone procedury badawcze spełniają wszystkie kryteria dobrej praktyki laboratoryjnej.

Rozdział „wyniki” został podzielony na dwie części. W pierwszej z nich, obszerniejszej (s.102-161), zaprezentowano badania liposomowych formułacji berberyny, natomiast w drugiej, znacznie krótszej (s.162-174), wyniki badań formułacji imikwimodu. Wyniki badań biologicznych z części dotyczącej berberyny wykazały, że obydwie użyte linie komórkowe ludzkich gruczolakoraków są wrażliwe na cytotoksyczne działanie berberyny w formułacji liposomowej z witaminą C. Linia SW620 wydaje się być bardziej wrażliwa niż linia LS180 zarówno na wolną berberynę jak i na jej formułację liposomową. Co ciekawe jednak prawidłowe ludzkie fibroblasty jelita CCD112 CoN cechują się umiarkowaną wrażliwością na efekty cytotoksyczne wolnej berberyny (około 50% komórek przeżywa traktowanie r-rem 50uM przez 72 godziny), natomiast są praktycznie niewrażliwe na formułację liposomową berberyny (z wit. C) o tym samym stężeniu. Jak wytłumaczyć tę wybiórczość działania formułacji liposomowej berberyny względem komórek nowotworowych? Czy powyższe formułacje działałyby tak samo skutecznie wobec komórek nowotworowych o spowolnionym bądź zatrzymanym cyklu komórkowym? Czy istnieją znaczące różnice pomiędzy średnim czasem podziałów komórek CCD112CoN, a komórek użytych linii nowotworowych? Intrygujący jest również wynik traktowania fibroblastów formułacją „pustych” liposomów z wit. C o stężeniu 100uM przedstawiony na Rys. 36. Formułacja ta wykazuje znacznie wyższy efekt cytotoksyczny niż wolna berberyna. Na rysunku 35 ta sama formułacja „pustych” liposomów z witaminą C nie ma wpływu na żywotność linii SW620 po 72 godzinach, za to zabija niemal 100% komórek linii LS180 (rys. 34). Jak można wytłumaczyć te rozbieżności działania tej samej formułacji? W dalszej części pracy przebadano formułacje liposomowe berberyny z witaminą C, które wywoływały kilkukrotnie wyższy przyrost reaktywnych form tlenu (ROS) w komórkach linii gruczolakoraków jelita grubego wskazując na możliwy synergizm działania obydwu substancji. Co więcej, uzyskane wyniki potwierdziły, że wzrost ROS w badanych liniach nowotworowych korelował ze spadkiem poziomu ATP i GSH, destabilizacją potencjału błony mitochondrialnej i wycieku jonów  $Ca^{2+}$  do cytozolu, przy braku aktywacji kaspaz. Powyższe cechy śmierci komórek nowotworowych wywoływane przez berberynę sugerują, wraz z udokumentowanym poglądomo na rysunkach 53-60 przemieszczeniem kalretikuliny na powierzchnię błony komórkowej, mechanizm immunogennej śmierci komórek (ICD). Tę tezę pośrednio popiera również obserwowane podwyższenie aktywności żernej makrofagów wobec komórek nowotworowych traktowanych

liposomową formuacją berberyny oraz synergizm jej działania z przeciwciałem anti-CD47, w stymulacji fagocytozy linii SW620. Nie znalazłem w pracy informacji, czy ocenie poddana była ekspresja powierzchniowa cząsteczki CD47 na nietraktowanych/traktowanych formuacjami berberyny komórkach linii LS180 i SW620?

W drugiej części wyników opisano po raz pierwszy metodę aktywnego zamykania imikwimodu w PEGyloowanych liposomach opartą na zastosowaniu kwasu askorbinowego, askorbinianu amonu oraz siarczanu amonu. Formuacja liposomów z witaminą C okazała się najstabilniejszą ze wszystkich uzyskanych formuacji o niemalże 100% retencji zamkniętego imikwimodu po 80 dniach w temperaturze 4 °C. Liposomy te uwalniały około 50% leku po 15 minutowej inkubacji z osoczem ludzkim, najprawdopodobniej (jak sugeruje Autorka) poprzez destabilizujące gradient pH w liposomach działanie komponentów dopełniacza. W ramach pracy doktorskiej oceniono także cytotoksyczność otrzymanych liposomowych formuacji imikwimodu wobec linii THP-1 po 24 godzinach inkubacji, co pozwoliło na wybranie stężenia 5µg/ml imikwimodu do dalszych badań. W takim stężeniu formuacje liposomowe wywoływały ekspresję kalretikuliny na powierzchni makrofagów linii THP-1. Zwiększenie aktywności żernej makrofagów obserwowano dla formuacji z witaminą C wobec linii SW620. Nie zaobserwowano jednak efektu synergizmu po podaniu tejże formuacji w kombinacji z przeciwciałem anti-CD47. Wręcz przeciwnie, przeciwciało zdawało się hamować fagocytozę. Czy potwierdzono swoistość tego klonu wobec ludzkiej cząsteczki CD47? Czy możliwe są oddziaływania fragmentu Fc tego przeciwciała z receptorami na powierzchni makrofagów THP-1, które hamowałyby proces fagocytozy?

W dyskusji Autorka konfrontuje uzyskane wyniki z literaturą przedmiotu. Bardzo interesująco i krytycznie przedyskutowała parametry stabilności substancji aktywnej wewnątrz liposomów oraz czynników (skład lipidowy, parametry rozpuszczalności substancji bioaktywnej) wpływających na dynamikę jej uwalniania. Ciekawe są również przewidywania aktywności biologicznej otrzymanych formuacji berberyny w modelach *in vivo*, gdzie na przykład (s.180) spekuluje, że wyciek części berberyny z liposomów do krwioobiegu przed ich kumulacją w guzie mógłby stymulować aktywność żerną makrofagów. Akumulacja berberyny w guzie nowotworowym, w następstwie mechanizmu pasywnego ukierunkowania mogłaby mieć bezpośredni efekt cytotoksyczny wobec komórek nowotworowych. Ten aspekt podwójnej aktywności biologicznej berberyny stanowi o oryginalności pomysłu na niniejszy projekt doktorski. Wykazanie, że berberyna może wpływać zarówno na pobudzenie aktywności żernej makrofagów jak i zabijać komórki nowotworowe w sposób promujący ich fagocytozę jest nowatorskie i inspirujące.

### **3. Podsumowanie:**

Podsumowując, przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska, stanowi oryginalne rozwiązanie istotnego problemu naukowego, wykazuje ogólną wiedzę Doktorantki oraz umiejętność

samodzielnego prowadzenia przez Nią badań naukowych, prezentacji i krytycznej dyskusji ich wyników. Wartość naukowa prezentowanych badań jest znacząca biorąc pod uwagę, że wytworzono i scharakteryzowano oryginalne formułacje liposomowe substancji biologicznie aktywnych o właściwościach pożądanych dla immunoterapii nowotworów opartej na stymulacji fagocytozy. Wyniki tych badań przyczyniają się do postępu w dyscyplinie naukowej reprezentowanej przez Doktorantkę.

#### **4. Wniosek końcowy:**

W mojej ocenie przedłożona mi do recenzji rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595, z późn. zm.).

Dlatego przedkładam wysokiej Radzie Dyscypliny Naukowej Nauki Biologiczne Uniwersytetu Wrocławskiego we Wrocławiu wniosek o dopuszczenie Pani mgr inż. Martyny Marii Mianowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Biorąc pod uwagę wartość naukową uzyskanych wyników oraz oryginalne rozwiązanie problemu badawczego istotnego dla immunoterapii nowotworów, wnioskuję o wyróżnienie niniejszej rozprawy doktorskiej.



Arkadiusz Miązek