

Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu DZIEKANAT WYDZIAŁU LEKARSKIEGO	
wpi. dnia	22-08-2019
L.dz. DL /	2756/18
Znak sprawy DL	

Recenzja

w postępowaniu habilitacyjnym dr inż. Joanny Rossowskiej – adiunkta w Samodzielnym Laboratorium Biologii Komórek Macierzystych i Nowotworowych Instytutu Immunologii i terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu.

Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu
WYDZIAŁ LEKARSKI
DZIEKANAT
prof. dr. hab. Małgorzata Sobieszczkańska

I. Ocena osiągnięć naukowo-badawczych

1. Ocena cyklu publikacji powiązanych tematycznie pt. „Zwiększenie skuteczności terapii przeciwnowotworowej z udziałem komórek dendrytycznych poprzez immunomodulację mikrośrodowiska nowotworowego w mysim modelu raka jelita grubego” = **ocena osiągnięcia naukowego.**

W doświadczalnej immunoterapii przeciwnowotworowej opartej na komórkach dendrytycznych (DC) zaproponowano już różne strategie stymulacji antygenami nowotworowymi. Uważa się, że DC stymulują naiwne komórki T CD4+, które są kluczowym elementem wielu mechanizmów odpornościowych.

Istnieje szereg danych stwierdzających, że genetycznie zmodyfikowane DC zaangażowane w szczepionki komórkowe są w stanie wywołać długotrwałe opóźnienie wzrostu guza wraz ze wzrostem liczby cytotoksycznych komórek T, jak również limfocytów wytwarzających cytokiny. Skuteczność protokołów klinicznych wykorzystujących różne rodzaje szczepionek opartych na DC jest nadal niezadowolająca i wymaga dalszych badań. Szczególnie obiecującym kierunkiem badań na zwierzętach jest połączenie chemioterapii z immunoterapią w różnych nowotworach.

Z powyższych względów podjęcie prac, których celem było poznanie potencjału przeciwnowotworowego komórek dendrytycznych i wybranych czynników immunomodulujących, należy uznać za w pełni uzasadnione nie tylko w sensie poznawczym ale również ze względu na możliwość wykorzystania w przyszłości uzyskanych wyników w praktyce klinicznej.

W pierwszej z cyklu prac badania dotyczyły oceny skuteczności terapii przeciwnowotworowej mysiego raka jelita grubego z zastosowaniem komórek dendrytycznych stymulowanych antygenami nowotworowymi w skojarzeniu z cyklofosfamidem (CY) oraz DC modyfikowanymi genetycznie do nadprodukcji IL-12.

W pracy wykazano, że CY zwiększa aktywność przeciwnowotworową szczepionek opartych na DC. Skojarzone zastosowanie cyklofosfamidu i DCs/Tag znacząco zwiększało aktywność przeciwnowotworową w modelu mysiego raka jelita grubego, co należy uznać za ważne osiągnięcie naukowe Habilitantki. W tym miejscu można dyskutować ze sformułowanymi osiągnięciami zamieszczonymi w autoreferacie.

Autorka za najważniejsze osiągnięcia uważa m.in. „Wykazanie **skuteczności** przeciwnowotworowej terapii skojarzonej...” Z pracy opublikowanej w J.Immunother.

wynika, że wykazano zwiększoną aktywność przeciwnowotworową w skojarzonym zastosowaniu CY i modyfikowanych DC/IL12.

W tym miejscu nasuwa się pytanie czy została wykonana dawko-zależność cyklofosfamidu i zastosowanych DC. Wartość pracy znacznie by zyskała gdyby doświadczenia przeciągnięto w czasie. Czy po kilku tygodniach stosowania skojarzonej terapii doszłoby do całkowitego wyleczenia?(skuteczność terapii !) Uwaga ta nasuwa się po lekturze autoreferatu gdzie Habilitantka przytacza wyniki innych autorów stosujący podobny model badawczy. Gonzalez-Aparicio_ i wsp. uzyskali całkowitą eradykację guza , a 25% myszy odrzuciło powtórny przeszczep raka jelita grubego. Tym niemniej praca dr Rossowskiej została opublikowana w prestiżowym czasopiśmie specjalistycznym i posiada dużą wartość poznawczą , a w przyszłości być może również aplikacyjną.

Celem drugiej pracy opublikowanej w Immunobiology była odpowiedź na pytanie czy krótkotrwała eliminacja IL-10 może wzmocnić działanie chemioimmunoterapii złożonej z CY i DCs/Tag lub CY i mieszaniny komórek DCs/Tag i DCs/IL-12. Podobnie jak w przypadku pierwszej pracy nasuwa się pytanie dlaczego zastosowano tylko jednokrotną dawkę CY , dlaczego nie stosowano chemioimmunoterapii przez dłuższy czas aby stwierdzić czy stosowana terapia jest w stanie wyleczyć chore myszy. Uzyskane wyniki wskazują, że czasowa eliminacja IL-10, poprzez podanie przeciwciał neutralizujących, jest skutecznym sposobem na zmniejszenie supresji immunologicznej związanej z aktywnością MDSC i stanowi przydatną strategię do wzmocnienia działania przeciwnowotworowego szczepionek opartych na komórkach dendrytycznych stymulowanych antygenami nowotworowymi. Praca stanowi ciekawy przyczynek do licznych badań mających na celu wzmocnienie działania przeciwnowotworowego CY i DCs/Tag i z pewnością jest znaczącym osiągnięciem naukowym Habilitantki.

Praca opublikowana w Front. Immunology stanowi pogłębione studium zmian zachodzących w lokalnej i systemowej odpowiedzi immunologicznej po podaniu wektorów lentiwirusowych kodujących sekwencję shRNA wyciszającą ekspresję TGF- β 1. Za oryginalne osiągnięcie w skali światowej można uznać wykazanie skuteczności wewnątrzguzowego zastosowania wektorów lentiwirusowych niosących sekwencje shRNA specyficzne dla TGF- β 1 w terapii CY i DCs. Komórki MC38 z wyciszoną ekspresją TGF- β 1 powodowały redukcję aktywności supresyjnej komórek MDSC i T reg. Na podkreślenie zasługuje zastosowanie różnych dawek modyfikowanych komórek dendrytycznych oraz dwukrotne podanie CY w części doświadczeń.

Szczególną uwagę zwraca schemat immunoterapii, który został uzupełniony podaniem jednokrotnej dawki CY poprzedzającej podania DCs wektora lentiwirusowego wyciszającego ekspresję TGF- β 1. Na 32 dzień po zaszczepieniu komórkami nowotworowymi średnia objętość ocenianych guzów MC38 wynosiła 80 mm³ a pięć z ośmiu myszy odrzuciło przeszczep, natomiast średnia objętość guzów MC38 / shN wyniosła 150 mm³ a trzy z ośmiu myszy odrzuciły guzy. W tym samym czasie kontrolne guzy MC38 z nietransdukowanymi komórkami osiągnęły średnią objętość 1330 mm³. Wyniki te dobitnie świadczą o skuteczności zastosowanej skojarzonej terapii i stanowią znaczące osiągnięcie naukowe o dużym potencjale aplikacyjnym. Osiągnięcie to bardzo mocno podbudowuje tezę, że redukcja TGF- β 1 w środowisku nowotworu jest bardzo ważnym aspektem terapii przeciwnowotworowej. Osiągnięcie długotrwałego efektu jest tego najlepszym dowodem.

Czwarta praca przedstawiona jako osiągnięcie naukowe (J.Exp.Clin. Cancer Res.2018) stanowi kontynuację badań nad wpływem eliminacji IL-10 z mikrośrodowiska guza na skuteczność immunoterapii przeciwnowotworowej z udziałem komórek dendrytycznych.

Duża ilość czynników immunosupresyjnych obecnych w mikrośrodowisku guza zmniejsza skuteczność szczepionek przeciwnowotworowych. Dlatego wyciszenie IL-10 przy użyciu wektorów lentiwirusowych z sekwencjami kodującymi shRNA specyficznymi dla IL-10 (shIL10 LV) w mysim raku okrężnicy MC38 było logicznym następstwem wcześniej wykonanych badań. Wektory shIL10 LV były podawane doguzowo dzień przed podaniem DCs/Tag. Podobny układ doświadczalny uzupełniono wcześniejszym podaniem CY. W pracy wykazano skuteczność eliminacji IL-10 z komórek mieloidalnych przy pomocy wektorów lentiwirusowych.

Uzyskane dane pokazują, że zmiana mikrośrodowiska guza przez LV shIL10 i CY zwiększa aktywność DCs. Z drugiej strony nie zaobserwowano zwiększenia efektu przeciwnowotworowego modyfikowanych DCs w kombinacji z LV shIL10, pomimo jak podaje autorka same lentiwektory powodowały zahamowanie wzrostu guzów na poziomie 70%. Poprzez skojarzone działanie DCs i CY uzyskano najlepszy efekt w badanym układzie doświadczalnym. Przedstawione w pracy wyniki poszerzają naszą wiedzę na temat skojarzonych terapii z zastosowaniem modyfikowanych komórek dendrytycznych i wytyczają dalsze kierunki badań z wykorzystaniem różnych wektorów lentiwirusowych niosących sekwencje wyciszające określone cytokiny. Wyniki pracy stanowią ważne osiągnięcie naukowe dr Rossowskiej i zostały opublikowane w prestiżowym czasopiśmie.

Piąta praca opublikowana w *Front.Immunology* porusza bardzo istotny problem poszukiwania nowych nośników wykorzystywanych w badaniach aktywności przeciwnowotworowej. Celem pracy było opracowanie metody izolacji i analiza aktywności przeciwnowotworowej egzosomów i mikropęcherzyków wydzielanych przez komórki MC38 modyfikowane do nadprodukcji IL-12 i shRNA dla TGF- β 1.

Wcześniejsze dane wskazywały, że modyfikacja genetyczna komórek guza to skuteczna metoda zmiany pochodzących z nowotworów egzosomów i mikropęcherzyków w środki, które mogą mieć działanie przeciwnowotworowe. Mikropęcherzyki są źródłem antygenów nowotworowych, które wykorzystano do szczepienia myszy z przeszczepem raka jelita grubego MC38. Uzyskane wyniki wykazały, że modyfikacja genetyczna komórek nowotworowych MC38 typu dzikiego jest możliwa dzięki zastosowaniu egzosomów i mikropęcherzyków wydzielanych przez komórki nowotworowe MC38 (zarówno TEx, jak i TMv). Oryginalnym osiągnięciem było wykazanie, że egzosomy wydzielane przez komórki nowotworowe modyfikowane do nadprodukcji IL-12 i/lub shRNA dla TGF- β 1 są bardzo dobrym nośnikiem cząsteczek immunomodulujących. Dane te pokazują nowe możliwości szerokiego wykorzystania modyfikowanych egzosomów pochodzenia nowotworowego w przyszłych skojarzonych immuno- i chemioterapiach przeciwnowotworowych.

W podsumowaniu stwierdzam, że osiągnięcia naukowe prezentowane w cyklu publikacji powiązanych tematycznie stanowią istotny wkład w poznawaniu mechanizmów i rozwoju naszej wiedzy w zakresie skojarzonej chemio- i immunoterapii. Osiągnięcia naukowe, które oceniam bardzo wysoko, poszerzają naszą wiedzę z zakresu skojarzonej terapii przeciwnowotworowej z udziałem cyklofosfamidu, komórek dendrytycznych stymulowanych antygenami nowotworowymi i/lub modyfikowanych genetycznie w celu zwiększenia ich potencjału przeciwnowotworowego. Znaczącym wkładem w dziedzinie immunoterapii było wykazanie przez dr Rossowską potencjału przeciwnowotworowego egzosomów izolowanych z komórek nowotworowych genetycznie modyfikowanych. Osiągnięcie to otwiera nowe możliwości w poszukiwaniu skutecznych terapii przeciwnowotworowych. Na podkreślenie zasługuje wiodący wkład Habilitantki w koncepcję wszystkich przeprowadzonych w ramach tzw. osiągnięcia naukowego badań, których zostały opublikowane w prestiżowych czasopismach naukowych o światowym zasięgu.

2. Ocena dorobku naukowego po uzyskaniu stopnia doktora = **ocena istotnej aktywności naukowej.**

Dorobek naukowy po uzyskaniu stopnia doktora obejmuje 26 publikacji oryginalnych i dwie prace poglądowe, trzy wykłady wygłoszone w placówkach zagranicznych i pięć w macierzystym Instytucie. Zaskakuje tylko jedna praca oryginalna z pierwszym autorstwem. Co więcej tylko w tej jednej publikacji wkład Habilitantki polegał na współtworzeniu koncepcji pracy. W pozostałych pracach udział polegał głównie na wykonaniu określonych eksperymentów, pomiarów, określeniu zmian itp. A przecież habilitacja to furtka do samodzielności naukowej, gdzie tworzenie nowych koncepcji badawczych to główne zadanie samodzielnego pracownika nauki.

Habilitantkę w autoreferacie opisała przebieg pracy naukowej po uzyskaniu stopnia doktora i zainteresowania badawcze, które są bardzo spójne tematycznie. Obejmowały one badania nad zwiększeniem potencjału przeciwnowotworowego komórek dendrytycznych poprzez modulację mikrośrodowiska nowotworowego oraz transfer związków przeciwnowotworowym do komórek rakowych. Badania te stanowiły doskonały punkt wyjściowy do prac zaplanowanych jako tzw. „rozprawa habilitacyjna”.

Po doktoracie, z zastrzeżeniem w/wsp., Habilitantka prowadziła badania, które miały na celu scharakteryzowanie mieloidalnych komórek supresorowych pochodzenia nowotworowego izolowanych z mysiego raka jelita grubego. Godnym podkreślenia jest fakt opracowania metody indukcji mieloidalnych komórek supresorowych pochodzenia nowotworowego z komórek szpikowych i z hodowli in vitro komórek mysiego raka jelita grubego. Ważnym osiągnięciem było wyciszenie w MDDC IL-10 i IL10R przy użyciu wektorów lentiwirusowych z sekwencjami kodujących siRNA specyficznymi dla IL-10 i IL10R. Badania te były podstawą do oceny lokalnej odpowiedzi immunologicznej przeciwko komórkom MC38.

W badaniach zespołu, w którym brała udział dr Rossowska opracowano metodykę uzyskiwania nowej substancji czynnej LOS-OH o działaniu przeciwnowotworowym. Wykazano również wpływ stymulujący LOS-OH na komórki immunokompetentne w warunkach in vitro i in vivo. Wyniki tych badań stanowią podstawę patentu, którego dr Rossowska jest współautorem.

Ważnym osiągnięciem w badaniach możliwości wykorzystania elektroporacji w terapii przeciwnowotworowej było wykazanie, że elektroporacja znacznie wzmacnia transport do komórki nowotworowej wybranych cytostatyków, substancji pochodzenia naturalnego, związków fotouczulających oraz różnych nośników. Osiągnięcie to

otwiera nowe możliwości zastosowania elektroporacji w skojarzeniu z chemioterapią i innymi sposobami leczenia wymagającymi efektywnego wprowadzenia leku do komórki docelowej. O wysokiej randze uzyskanych wyników świadczy ich opublikowanie w bardzo dobrych czasopismach specjalistycznych.

W podsumowaniu uważam, że osiągnięcia naukowe, uzyskane po otrzymaniu stopnia doktora, stanowią znaczący wkład w poznanie i rozwój nowych możliwości terapeutycznych nie tylko chorób nowotworowych. Dr Rossowska wykazała istotną aktywność naukową w pracy zespołowej, której efektem były liczne publikacje w prestiżowych czasopismach specjalistycznych.

O dużych możliwościach aplikacyjnych osiągnięć naukowo-badawczych po uzyskaniu stopnia doktora najlepiej świadczy udzielenie patentu zespołowi badawczemu, w którym uczestniczyła dr Rossowska.

3. Sumaryczny impact factor wynosi 107,47 w tym dla prac z cyklu habilitacyjnego 24,03, prac opublikowanych po doktoracie 73,29.

4. Liczba cytowań – 343, w tym dla prac z cyklu habilitacyjnego 27, prac opublikowanych po doktoracie 212.

Cytowalność prac z cyklu habilitacyjnego z pewnością znacząco wzrośnie w najbliższych latach z uwagi na wysoką rangę opublikowanych wyników.

5. Indeks Hirscha – 13

Powyższe wskaźniki bibliometryczne bardzo dobrze świadczą o wysokim poziomie prac publikowanych przez dr Rossowska i wsp. z zastrzeżeniem wyżej opisanym.

6. Kierowanie międzynarodowymi lub krajowymi **projektami badawczymi** lub udział w takich projektach.

Dr Rossowska brała udział w realizacji 15 projektów badawczych krajowych, w tym 5 jako kierownik projektu i w 1 jako opiekun naukowy. W tym miejscu ponownie zdziwienie budzi fakt kierowania 5 projektami i tylko jedna praca + cykl habilitacyjny z pierwszym autorstwem.

7. Międzynarodowe lub krajowe **nagrody** za działalność naukową

Dr Rossowska trzykrotnie otrzymała nagrodę Dyrektora IITD PAN w tym jeden raz za osiągnięcia naukowe i organizacyjne oraz dwukrotnie za opublikowanie pracy oryginalnej o najwyższym współczynniku oddziaływania w roku 2017 i 2018. Te dwie ostatnie nagrody świadczą dobitnie o randze osiągnięć naukowych Habilitantki, które były jej dziełem w ostatnich latach.

8. Wygłoszenie referatów na międzynarodowych lub krajowych konferencjach tematycznych.

Zadziwiający jest brak wygłoszonych referatów wobec udziału (lub tylko zgłoszenia streszczenia bądź plakatu ??) w bardzo licznych konferencjach międzynarodowych (52 razy !!) i krajowych (26 razy !!).

II. Ocena dorobku dydaktycznego i popularyzatorskiego oraz współpracy międzynarodowej

1. Uczestnictwo w programach europejskich lub krajowych

Dr Rossowska w latach 2018-2019 była członkiem zespołu ds. Programu Interdyscyplinarnych Studiów Doktoranckich w IITD PAN w ramach programu BioTechNan finansowanego z Funduszy Europejskich.

2. Udział w międzynarodowych lub krajowych konferencjach naukowych lub udział w komitetach organizacyjnych tych konferencji.

W zał. 3 zestawiono opublikowane streszczenia konferencyjne . Na ich podstawie trudno ocenić aktywny udział w konferencjach, czy były to tylko streszczenia czy być może plakaty ? Brak jest wzmianki o wygłoszonych referatach na konferencjach krajowych i zagranicznych.

Habilitantka była członkiem komitetu naukowego Sesji Specjalnych „Analysis of Image , Video and Motion Data in Life Science” w Wietnamie, Japonii i w Indonezji.

Była również członkiem komitetu naukowego i organizacyjnego trzech konferencji we Wrocławiu.

3. Otrzymane nagrody i wyróżnienia

Dr Rossowska jest laureatką konkursu organizowanego w roku 2016 przez Ambasadę Francuską na stypendium w Centre de Biophysique Moleculaire, Orleans, Francja.

4. Udział w konsorcjach i sieciach badawczych

Brak informacji

5. Kierowanie projektami realizowanymi we współpracy z naukowcami z innych ośrodków polskich i zagranicznych

Brak informacji

6. Udział w komitetach redakcyjnych i radach naukowych czasopism

Brak informacji

7. Członkostwo w międzynarodowych lub krajowych organizacjach i towarzystwach naukowych

Dr Rossowska jest sekretarzem Polskiego Towarzystwa Immunologii Doświadczalnej i Klinicznej od 2015r. Jest dwóch zespołów działających i IITD PAN we Wrocławiu.

8. Osiągnięcia dydaktyczne i w zakresie popularyzacji nauki

Dr Rossowska posiada wybitne osiągnięcia w zakresie popularyzacji nauki czego najlepszym dowodem jest zorganizowanie w latach 2005 – 2018 14 pokazów z zakresu cytometrii przepływowej i mikroskopii konfokalnej dla młodzieży w ramach Dolnośląskiego Festiwalu Nauki

9. Opieka naukowa nad studentami i magistrantami

Dr Rossowska posiada znaczące osiągnięcia dydaktyczne w zakresie dydaktyki przeddyplomowej jak i dydaktyki podyplomowej. Była opiekunem 16 studentów odbywających praktyki na Politechnice Wrocławskiej, Wydziale Chemicznym i Biotechnologii oraz na Uniwersytecie Wrocławskim, Wydziale Biotechnologii. Sprawowała opiekę naukową nad dwojgiem absolwentów w ramach staży organizowanych przez Powiatowy Urząd Pracy we Wrocławiu. Była również promotorem 8 prac magisterskich i jednej pracy inżynierskiej. Na podkreślenie zasługuje zorganizowanie i przeprowadzenie w 2016 roku kursu praktycznego z cytometrii przepływowej dla pracowników naukowych WCB.

10. Opieka naukowa nad doktorantami

Dr Rossowska prowadzi od roku 2013 wykłady dla uczestników Studium Doktoranckiego IITD PAN.

Sprawowała funkcję opiekuna pomocniczego nad jedną doktorantką.

11. Staże w zagranicznych lub krajowych ośrodkach naukowych

Dr Rossowska odbyła pięć krótkoterminowych staży naukowych w Centre de Biophysique Moleculaire UPR CNRS w Orlean, Francja(1 raz) i w Institute of Molecular Genetucs ANRC w Pradze (4 razy).

12. Wykonanie ekspertyz lub innych opracowań na zamówienie władzy publicznej
Brak informacji


13. Udział w zespołach eksperckich i konkursowych
Brak informacji

14. Recenzowanie projektów międzynarodowych lub krajowych oraz prac w czasopismach międzynarodowych i krajowych

Habilitantka wydała opinię i ocenę realizacji projektu w ramach Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka.

Recenzowała też prace w Post. Hig. Med. Dośw. (1x),w wydawnictwie Tygiel (1x) i w Lectures Notes in Artificial Intelligence (5X).

Na podstawie przeprowadzonej oceny stwierdzam, dr Rossowska spełnia ustawowe warunki i kryteria wymagane od kandydatów ubiegających się o stopień doktora habilitowanego. Wnoszę do Rady Naukowej IITD PAN we Wrocławiu o nadanie dr Rossowskiej stopnia doktora habilitowanego nauk medycznych w dyscyplinie biologia medyczna.


Prof. dr med. Jerzy Nowak