

Katedra i Klinika Pneumonologii, Onkologii
i Alergologii
Uniwersytetu Medycznego w Lublinie
ul. Jaczewskiego 8
Lublin 20-950
tel. (81) 724 44 31, (81) 724 42 93
fax (81) 724 48 23
kierownik:
Prof. dr hab. Janusz Milanowski



Department of Pneumonology, Oncology
and Allergology
Medical University of Lublin
Poland, Lublin 20-950
Jaczewskiego 8
tel. (+48-81) 724 44 31, (+48-81) 724 42 93
fax (+48-81) 724 48 23
Head:
Prof. Janusz Milanowski MD, PhD

e-mail: pulm.dept@umlub.pl

Lublin, dn. 3.11.2020.

RECENZJA

ROZPRAWY NA STOPIEŃ NAUKOWY DOKTORA NAUK MEDYCZNYCH I NAUK O ZDROWIU

MGR AGATY RANISZEWSKIEJ

PT. "OCENA IMMUNOGENNOŚCI NOWOTWOROWYCH KOMÓREK MACIERZYSTYCH

GRUCZOŁOWEGO RAKA PŁUCA"

Rak płuca jest najczęściej diagnozowanym nowotworem na świecie stanowiącym najczęstszą przyczynę śmierci wśród mężczyzn, a w krajach wysoko rozwiniętych również wśród kobiet. Rokowanie w tej chorobie jest niekorzystne, a odsetki przeżyć 5-cio letnich w stadiach zaawansowanych są niewielkie, szczególnie w przypadku nowotworu nieoperacyjnego w stadium IIIB i IV, kiedy to nie przekraczają kilku procent. Poza prewencją mającą na celu ograniczenie wpływu czynników środowiskowych, takich jak narażenie na dym tytoniowy oraz azbest, podejmowane są próby identyfikacji nowych markerów choroby nowotworowej w celu wczesnej i bezinwazyjnej diagnostyki raka płuca oraz przewidywania efektów nowych metod leczenia, w tym przede wszystkim immunoterapii.

W tę niezwykle ważną tematykę wpisuje się przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska mgr Agaty Raniszewskiej. Autorka podjęła się zbadania fenotypu oraz roli immunomodulującej macierzystych komórek nowotworowych pozyskiwanych z węzłów chłonnych u chorych na niedrobnokomórkowego raka płuca (NDRP). Nowotworowe komórki macierzyste (CSCs, *cancer stem cells*) zidentyfikowano po raz pierwszy w 1990 r. u chorych na ostrą białaczkę szpikową. Następnie udowodniono obecność CSCs u chorych na guzy lite zarówno w guzie pierwotnym, przerzutach, jak i we krwi obwodowej (płynna biopsja). CSCs powstają w wyniku akumulacji mutacji, zmian genetycznych i epigenetycznych w zwykłych

komórkach macierzystych. Potencjalnym źródłem CSCs u chorych na raka płuca mogą być komórki macierzyste oskrzeli i pęcherzyków płucnych. Komórki macierzyste w większości chorób nowotworowych stanowią unikalną grupę komórek, dlatego ich rola nie jest dobrze poznana. Ich liczba rośnie jednak wraz ze wzrostem stadium zaawansowania nowotworu. CSCs pozostają w ścisłej integracji z komórkami układu immunologicznego w mikrośrodowisku guza. CSCs mogą inicjować ucieczkę guza spod nadzoru immunologicznego dzięki inaktywacji funkcji limfocytów T cytotoksycznych i promowaniu środowiska immunosupresyjnego. Jedną z metod identyfikacji CSCs jest cytomteria przepływowa, która umożliwia ponadto poznanie fenotypu macierzystych komórek nowotworowych.

Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska ma charakter opracowania opartego o zbiór już opublikowanych monotematycznych artykułów naukowych. Rozprawa liczy 75 stron maszynopisu. Składa się ze streszczenia w języku polskim i angielskim, spisu skrótów, wstępu, założeń i celu pracy, kopii trzech artykułów będących podstawą rozprawy doktorskiej, podsumowania i wniosków oraz zgody komisji bioetycznej na przeprowadzenie badań, oświadczeń współautorów w sprawie zgody na wykorzystanie publikacji w rozprawie doktorskiej i spisu piśmiennictwa wykorzystanego we wstępie pracy.

W liczącym 10 stron wstępie autorka przedstawiła pobieżnie dane dotyczące epidemiologii raka płuca, metod diagnostycznych oraz zasad leczenia tej choroby w zależności od rozpoznania patomorfologicznego i stopnia zaawansowania. Więcej uwagi doktorantka poświęciła nowatorskim zagadnieniom roli nowotworowych komórek macierzystych w rozwoju chorób nowotworowych i modulacji przez nie mikrośrodowiska guza ze szczególnym uwzględnieniem immunosupresyjnej roli CSCs. Z uwagi na skrótowy charakter wstępu wkradły się do niego pojedyncze błędy. Nie wszystkie skróty zostały przetłumaczone w tekście. Autorka powinna zdecydować się czy w sposób jednolity tłumaczyć skróty w tekście, czy objaśnić je tylko w wykazie skrótów zawartych na początku rozprawy. Ponadto w polskich tekstach nie powinno wykorzystywać się skrótów angielskich, jeśli istnieją ich polskie odpowiedniki (np. NDRP zamiast NSCLC). Doktorantka wymieniła tylko te terapie ukierunkowane molekularnie, które są w Polsce refundowane (inhibitory kinaz tyrozynowych EGFR, ALK i ROS1). Tymczasem w Unii Europejskiej zarejestrowano znacznie więcej tego typu terapii u chorych na NDRP, np. inhibitory NTRK, BRAF i MEK. Autorka zwraca uwagę, że jedynym zwalidowanym markerem predykcyjnym dla immunoterapii u chorych na NDRP jest zbadanie ekspresji PD-L1 na komórkach nowotworowych. Tymczasem pembrolizumab uzyskał w Stanach Zjednoczonych rejestrację

do leczenia chorych na nowotwory z wysokim obciążeniem mutacyjnym komórek nowotworowych (TMB, *tumor mutation burden*) oraz w terapii chorych na raka jelita grubego i odbytnicy z wysoką niestabilnością mikrosatelitarną (MSI, *microsatellite instability*). Doktorantka wymieniając różne immunologiczne punkty kontrolne zapomniała o jednym z najważniejszych z nich – CTLA-4 (*cytotoxic T cel antygen 4*), który stał się pierwszym celem dla immunoterapii chorych na czerniaka za pomocą ipilimumabu. Nazwy genów, w odróżnieniu od nazw ich białkowych produktów, powinny być pisane kursywą. Powyższe uwagi nie umniejszają jednak bardzo wysokiej wartości merytorycznej przeprowadzonych badań oraz całości rozprawy doktorskiej.

Założenia i cele pracy zostały sformułowane w sposób jasny i odpowiadający założeniom metodologicznym pracy.

Podstawą pracy doktorskiej mgr Agaty Raniszewskiej jest zbiór trzech oryginalnych artykułów opublikowanych w latach 2019 – 2020. We wszystkich trzech artykułach doktorantka jest pierwszym autorem. Artykuły te ukazały się w recenzowanych czasopismach posiadających wysoki współczynnik *Impact Factor* od 5,316 do 6,162 pkt (sumarycznie 16,884 pkt) oraz punktację MNiSW od 100 do 140 pkt (sumarycznie 380 pkt). Doktorantka uzyskała zgodę pozostałych autorów na wykorzystanie tych artykułów w rozprawie doktorskiej. Artykuły stanowią spójną całość. Wszystkie dotyczą fenotypu i zdolności immunomodulujących macierzystych komórek nowotworowych uzyskanych z węzłów chłonnych klatki piersiowej u chorych na NDRP. Materiał został pobrany w drodze biopsji cienkoigłowej przeprowadzanej pod kontrolą USG wewnątrzskrzelowego podczas bronchoskopii (EBUS-TBNA, *endobronchial ultrasound transbronchial fine needle aspiration*).

W publikacji „PD-L1 expression on lung cancer stem cells in metastatic lymph nodes aspirates”, która ukazała się w 2019 roku w *Stem Cell Review* autorzy opisują sposób identyfikacji nowotworowych komórek macierzystych we krwi obwodowej oraz w aspiratach węzłów chłonnych chorych na NDRP za pomocą metod cytometrii przepływowej. Zbadano także ekspresję cząsteczki PD-L1 na CSCs, której obecność może być związana z opornością CSCs na działanie układu immunologicznego i brak eliminacji tych komórek przez limfocyty T cytotoksyczne. Analiz dokonano u chorych z różnym podtypem patomorfologicznym NDRP, którzy dodatkowo mieli wykonane badania molekularne podstawowych czynników predykcyjnych w celu kwalifikacji do terapii ukierunkowanych molekularnie. Praca ta stanowi punkt wyjścia dla pozostałych dwóch publikacji.

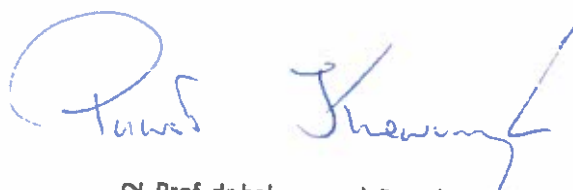
W artykule „PD-L1+ lung cancer stem cells modify the metastatic lymph nodes immunomicroenvironment in nsccl patients” opublikowanym w *Cancer Immunology and Immunotherapy* w 2020 roku porównano dwa panele przeciwciał monoklonalnych stosowanych do cytometrycznej identyfikacji CSCs (anty-CD45, anty-EpCAM, anty-CXCR4+ oraz anty-CD45, anty-EpCAM, anty-CXCR4, anty-CD133, anty-CD44, anty-CD90). W aspiratach z węzłów chłonnych przeprowadzono także ocenę fenotypu różnych populacji limfocytów: Th, T cytotoksycznych i Treg. Na powierzchni limfocytów oceniono ekspresję markerów aktywacji: CD28, CD27, OX40 oraz markerów wyczerpania ich funkcji: PD-1, Tim3, Lag3, Fas. Ponadto wyniki badań immunologicznych zostały skorelowane z wynikami badań molekularnych (badanie NGS u niektórych pacjentów) oraz ze skutecznością leczenia (chemioterapia, terapie ukierunkowane molekularnie, immunoterapia oraz terapie skojarzone), która była monitorowana wg kryteriów RECIST. Badania zostały wykonane w Laboratorium Badawczym Kliniki Chorób Płuc Erasmus Medical Center w Rotterdamie.

W ostatniej pracy opublikowanej w 2020 roku w *Cancers* pt. “Immunomodulatory molecules on lung cancer stem cells from lymph nodes aspirates” zbadano ekspresję na CSCs innych cząstek modulujących reakcję układu odpornościowego: PD-L1, Fas, FasL, CD73, CD47 w aspiratach węzłów chłonnych u chorych na NDRP. Oceniono także ekspresję cząsteczki Fas na powierzchni limfocytów, której obecność, w wyniku interakcji z FasL, może doprowadzić do apoptozy limfocytów. Na limfocytach CD4+ i CD8+ analizowano również ekspresję immunologicznych punktów kontrolnych, biorących udział w wyhamowaniu odpowiedzi immunologicznej: PD-1 i LAG3. W pracy tej udowodniono, że odsetek CSCs z ekspresją PD-L1 koreluje z fenotypem subpopulacji limfocytów w mikrośrodowisku guza.

Całość opracowania stanowi bardzo logiczny ciąg publikacji o wysokiej wartości naukowej. Zwraca uwagę wysokiej klasy warsztat badawczy z wiodącą rolą wielokolorowej cytometrii przepływowej, jak i kompletność danych klinicznych uzyskanych od chorych na NDRP. Niezmiernie innowacyjny jest także cel i wyniki pracy. Po raz pierwszy dokonano identyfikacji CSCs w aspiratach z węzłów chłonnych u chorych na NDRP oraz zbadano ekspresję cząstek immunomodulujących na powierzchni CSCs z znaczeniem istnienia możliwych ich interakcji z cząsteczkami występującymi na powierzchni limfocytów. Udowodniono, że cytometria przepływowa jest właściwą metodą do analizy aspiratów pochodzących z biopsji cienkoigłowej węzłów chłonnych śródpiersia. Wszystkie te ważne odkrycia spowodowały wydanie pozytywnych opinii przez międzynarodowych recenzentów

artykułów, które dzięki temu mogły ukazać się w renomowanych czasopismach. Artykuły te zostały wykorzystane w rozprawie doktorskiej.

Podsumowując uważam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska mgr Agaty Raniszewskiej spełnia warunki określone w art. 13 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.) w związku z art. 179 ust. 1 Ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające Ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018 r. poz. 1669 z późn. zm.). Wnoszę do Rady Dyscypliny Nauk Medycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego wniosek o dopuszczenie mgr Agaty Raniszewskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie wnioskuję o wyróżnienie rozprawy doktorskiej ze względu na jej wybitny charakter.



1124262 Prof. dr hab. n. med. Paweł Krawczyk
lekarz chorób wewnętrznych
specjalista laboratoryjnej genetyki medycznej
specjalista laboratoryjnej immunologii medycznej