

mgr Agata Raniszewska

**Ocena immunogenności nowotworowych komórek macierzystych
gruczołowego raka płuca**

**Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu
w dyscyplinie nauki medyczne**

Promotor: prof. dr hab. n. med. Joanna Domagała-Kulawik

Katedra Patomorfologii Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego



Obrona rozprawy doktorskiej przed Radą Dyscypliny Nauk Medycznych
Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

Warszawa 2020

Streszczenie

Wprowadzenie: Rak płuca należy do najczęściej występujących nowotworów złośliwych i stanowi pierwszą lub jedną z pierwszych przyczyn zgonów z powodu tych nowotworów w Polsce i na świecie. Rokowanie w tym nowotworze jest bardzo poważne. Pewnym przełomem w osiągnięciu długotrwałego przeżycia okazała się w ciągu ostatnich lat immunoterapia. Podstawą rozwoju tego typu leczenia jest poznanie oddziaływania między komórkami gospodarza a komórkami nowotworowymi. Znany jest fakt istotnego osłabienia obrony przeciwnowotworowej i hamowania odpowiedzi immunologicznej w miejscu rozwoju guza. Nowotworowe komórki macierzyste (CSCs – cancer stem cells) są w dużej mierze odpowiedzialne za progresję nowotworu, tworzenie przerzutów i oporność na znane metody leczenia. Pewne przesłanki wskazują na możliwość udziału CSCs w modyfikowaniu odpowiedzi układu odporności.

Cel pracy: Celem badania była identyfikacja CSCs w mikrośrodowisku niedrobnokomórkowego raka płuca (NSCLC) z wyszczególnieniem podtypu raka gruczołowego (adenocarcinoma - ADC) z oceną elementów układu odporności: fenotypu limfocytów oraz analizą obecności i ekspresji cząsteczek modulujących reakcje układu odporności na CSCs i dojrzałych komórkach nowotworowych.

Metodyka: Wymienione populacje komórek były identyfikowane metodą cytometrii przepływowej w aspiratach z węzłów chłonnych uzyskanych drogą przezoskrzelowej biopsji igłowej pod kontrolą ultrasonografii wewnątrzoskrzelowej (EBUS/TBNA). W celu identyfikacji CSCs wykorzystano: przeciwciała: CD45, EpCAM, CXCR4, CD133, CD44, CD90.

Badano obecność następujących cząsteczek o właściwościach punktów kontrolnych na CSCs i dojrzałych komórkach raka: PD-L1, Fas, FasL, CD73, CD47. Oceniano następujące populacje limfocytów: CD8, CD4, komórki regulatorowe (Tregs) oraz ekspresję CD28, CD27, OX40, PD-1, LAG-3, Fas na limfocytach. Wyniki odniesiono do obecności lub nie przerzutów nowotworu w węzłach chłonnych, do danych klinicznych, profilu molekularnego ADC oraz wstępnych odpowiedzi na leczenie. Łącznie wykonano oznaczenia u 70 chorych na NSCLC. Uwzględniano chorych w trakcie diagnostyki nowotworu, przed leczeniem przeciwnowotworowym.

Wyniki: Zastosowanie przeciwciał: CD45, EpCAM, CXCR4, CD133, CD44, CD90 umożliwiło identyfikację CSCs w aspiratach z węzłów chłonnych. W szczególności: (i) zaobserwowano wyższe odsetki CSCs w przerzutowych węzłach chłonnych, niż w węzłach bez stwierdzonych przerzutów ($p < 0.001$); (ii) w przerzutowych węzłach chłonnych zaobserwowano negatywną korelację między odsetkiem PD-L1+ CSCs a odsetkiem limfocytów CD4+ oraz odsetkiem limfocytów CD4+CD28+ oraz pozytywną korelację między odsetkiem PD-L1+ CSCs a odsetkiem limfocytów: CD8+, Tregs, CD4+PD-1+ CD4+Tim3+; (iii) powyższe zmiany nie miały związku z profilem molekularnym guza, natomiast były bardziej wyrażone u chorych ze słabszą odpowiedzią na leczenie, (iv) CSCs wykazują ekspresję cząstek immunomodulujących: PD-L1, CD47, CD73, Fas oraz FasL, (v) zaobserwowano istotny związek pomiędzy dojrzałymi komórkami nowotworowymi wykazującymi ekspresję Fas-L a limfocytami T Fas+ w węzłach chłonnych oraz limfocytami CD4 i CD8 Fas+ we krwi obwodowej.

Wnioski: CSCs oraz subpopulacje limfocytów mogą być identyfikowane w aspiratach węzłów chłonnych uzyskanych w trakcie procedury EBUS/TBNA. Interakcje pomiędzy PD-L1+ CSCs a limfocytami T mogą sprzyjać anergii limfocytów T CD4+. Ekspresja molekuł kontrolnych (PD-L1, CD47, CD73, FasL, Fas) na powierzchni CSCs potwierdza postawioną tezę o immunosupresyjnych właściwościach CSCs, co może znaleźć zastosowanie praktyczne w prognozowaniu odpowiedzi na immunoterapię.

Agata
Rauinshe
Joan Szyszka Kuter