

Prof. dr hab. n. med. Artur Szlubowski
Kierownik Samodzielnej Pracowni Endoskopii
KSS im. Jana Pawła II
ul. Prądnicka 80
31-202 Kraków
e-mail: artur.szlubowski@gmail.com

Kraków, dnia 06.12.2020

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Agaty Raniszewskiej

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

Nowoczesne terapie ukierunkowane molekularnie stosowane w ostatniej dekadzie u chorych na niedrobnokomórkowego raka płuca (NSCLC), zwłaszcza z wykorzystaniem inhibitorów kinazy tyrozynowej (IKT) stanowią przełom w leczeniu onkologicznym. Jednak skuteczna terapia preparatami IKT obejmuje zaledwie ok. 15% chorych na zaawansowanego NSCLC, zwłaszcza raka gruczołowego. NSCLC należy do nowotworów litych występujących pod postacią zmian guzowatych bądź naciekowych, o słabo wyrażonej charakterystyce antygenowej. Mimo to, coraz większe znaczenie w leczeniu NSCLC na wszystkich etapach odgrywa także immunoterapia, oddziałująca na tzw. środowisko rozwoju raka za pomocą inhibitorów punktów kontrolnych (ICIs). Standardem diagnostyki NSCLC, zwłaszcza zaawansowanego raka płaskonabłonkowego stała się ocena ekspresji PDL-1 czyli ligandu dla receptora programowanej śmierci, występującego na powierzchni komórki nowotworowej, wiążącego się z receptorem PD-1, który występuje na powierzchni limfocytów czy makrofagów. Chociaż skuteczność stosowanych obecnie preparatów będących antagonistami rec. PDL-1, zwłaszcza gdy ich ekspresja wynosi >50%, jest potwierdzona w zaawansowanych postaciach raka płuca, jednak coraz częściej wykorzystuje się je także w terapii neoadjuwantowej, czy terapiach skojarzonych.

Jako że nadal, oprócz ekspresji PDL-1 nie opracowano innych zwalidowanych biomarkerów dla immunoterapii, poszukiwania naukowe zmierzają w kierunku badania nowych cząsteczek immunomodulujących tj. OX 40, CD 40, CD 47, Tim3, LAG3.

Badania dotyczące nowotworowych inicjujących komórek macierzystych (CSCs) trwają już od ponad 30 lat, jednak nadal mechanizm niewrażliwości CSCs na działanie konwencjonalnej radio- czy chemioterapii nie został poznany. Badania podążają także w kierunku oceny mikrośrodowiska guza (TME), czyli wzajemnego oddziaływania pomiędzy komórkami nowotworowymi, w tym także CSCs, a komórkami układu odpornościowego gospodarza, jednak konkluzyjnych doniesień dotyczących roli CSCs czy TME jest w piśmiennictwie stosunkowo niewiele.

Dlatego wysoko oceniam decyzję doktorantki, która w rzetelnym badaniu naukowym podjęła próbę identyfikacji CSCs, oceny obecności ekspresji cząstek modulujących reakcje układu odpornościowego w raku płuca takich jak PDL-1, czy analizę związku CSCs z obecnością molekuł kontrolnych i limfocytów, a przede wszystkim odniesienie uzyskanych wyników do danych klinicznych.

W prezentowanej rozprawie doktorantka dokonała takiej oceny w kilku badaniach przeprowadzonych w Katedrze Patomorfologii Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego oraz w Laboratorium Badawczym Kliniki Chorób Płuc Erasmus Medical Center w Rotterdamie, obejmujących okres badawczy czterech lat.

Przedstawiona do oceny rozprawa liczy 75 stron, obejmuje 22 strony *résumé* prezentowanej pracy, a następnie trzy publikacje ujęte w jeden cykl, pozytywną ocenę Komisji Bioetycznej przy Warszawskim Uniwersytecie Medycznym, oświadczenia współautorów oraz 48 prawidłowo dobranych pozycji piśmiennictwa. Wszystkie trzy prace zostały zrecenzowane i opublikowane w renomowanych czasopismach medycznych: *Stem Cell Review and Reports*, *Cancer Immunology and Immunotherapy* i *Cancers*. Ich sumaryczny współczynnik oddziaływania (IF) wyniósł 16,884 a punktacja MNiSW wyniosła 380 punktów.

W pierwszej publikacji, będącej niejako punktem wyjścia rozprawy, u 30 chorych na NSCLC zidentyfikowano CSCs (zdefiniowane jako EpCAM+/CD133+) i oznaczono po raz pierwszy w piśmiennictwie ekspresję PDL-1 na CSCs w aspiratach węzłów chłonnych uzyskanych metodą aspiracyjnej przezoskrzelowej biopsji cienkoigłowej (EBUS-TBNA) oraz we krwi obwodowej. Wykazano, że u 18 z nich u których potwierdzono przerzuty do węzłów chłonnych, zwłaszcza raka gruczołowego (ADC) i w IV stopniu zaawansowania, odsetek CSCs był istotnie większy. Dodatnią istotną korelację uzyskano także pomiędzy ekspresją EpCAM+/CD133+/PDL-1, a liczbą paczkołat.

Zachodzi zatem pytanie, jak na podstawie uzyskanych wyników można wytłumaczyć fakt, że ekspresja EpCAM+/CD133+/PDL-1 w grupie N1 była większa niż w N2 (choć różnice nie były istotne statystycznie) w przerzutowo zmienionych węzłach.

Wydaje się też interesujące, aby w przyszłości dokonać analizy korelacji ekspresji EpCAM+/CD133+/PDL-1 nie tylko w stadium IV, ale także w poszczególnych stadiach I-III NSCLC oraz u pacjentów z mutacją aktywującą EGFR czy rearanżacją genu ALK.

W drugiej publikacji zidentyfikowano komórki nowotworowe (zdefiniowane jako CD45-EpCAM+CXCR4+) oraz CSCs przy pomocy szerszego panelu markerów: CD45-EpCAM+CXCR4+CD133+CD44+CD90+ metodą cytometrii przepływowej materiału uzyskanego z aspiratów węzłów chłonnych pobranych od 20 chorych na NSCLC metodą EBUS-TBNA. Równocześnie przeprowadzono szczegółową ocenę populacji limfocytów: T CD4+, T CD8+ i Tregs (CD4+,CD127low,CD25high). Na wymienionych populacjach limfocytów oceniono obecność markerów aktywacji limfocytów T: CD28, CD27, OX40 oraz markerów wyczerpania limfocytów T: PD-1, Tim3, Lag3, Fas. W przerzutowych węzłach chłonnych zaobserwowano pozytywną korelację między odsetkiem PD-L1+CSCs, a odsetkiem limfocytów: Tregs, T CD4+PD-1+ T CD4+Tim3+ oraz negatywną między odsetkiem: limfocytów T CD4+ i T CD4+CD28+. Powyższe zmiany nie miały istotnego związku z profilem molekularnym guza, aczkolwiek 53% stanowili chorzy na ADC, a wykazana obecność zwłaszcza CD4+PD-1+ była bardziej wyrażona u chorych z szybką progresją choroby i ze słabszą odpowiedzią na leczenie; dalsze badania powinny doprecyzować powyższe obserwacje.

W trzeciej publikacji, w oparciu o poprzedzające dwie, opisujące obecność immunosupresyjnej cząstki PD-L1 na CSCs wykazano obecność ekspresji molekuł kontrolnych w chorobie nowotworowej takich jak: PD-L1, Fas, FasL, CD73, CD47 uzyskanych z bioptatów węzłów chłonnych; ponadto oznaczano obecność limfocytów T oraz obecność i ekspresję Fas na tychże limfocytach. Dodatkowo, w biopsji płynnej oznaczono odsetek limfocytów T: CD4+ i CD8+ oraz obecność cząstek immunomodulujących: PD-1, Fas, LAG3 na limfocytach.

Na podstawie przeprowadzonych badań doktorantka przedstawiła cztery istotne wnioski, z których wszystkie są słuszne i uzasadnione. Jedyne istotne ograniczenie pracy stanowi stosunkowo mała grupa badana – łącznie 70 chorych na NDRP, na podstawie której niektóre tezy będą wymagały potwierdzenia w dalszych badaniach, uwzględniających także w większym stopniu podtypy histologiczne i stadium zaawansowania choroby.

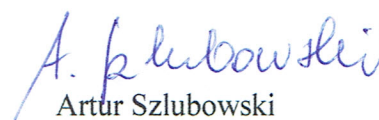
Wszystkie trzy publikacje mają nowatorski charakter i noszą znamiona oryginalności. Zostały napisane bardzo starannie i ujęte w logiczny cykl definiujący immunosupresyjne właściwości CSCs, co może znaleźć zastosowanie praktyczne w prognozowaniu odpowiedzi na immunoterapię. Autorka zachowuje odpowiednie proporcje poszczególnych rozdziałów publikacji, posługuje się zwięzłym i precyzyjnym językiem naukowym. W dyskusji wszystkich

prac doktorantka przeprowadza wywód żywo i interesująco, koncentrując się głównie na analizie własnego, dobrze zebranego materiału. Dla Recenzenta zabrakło szerszego omówienia wyników i dyskusji w języku polskim po rozdziale uzasadnienia połączenia wskazanych publikacji w jeden cykl. Dobór metod statystycznych we wszystkich trzech pracach należy uznać za poprawny.

Przedstawione uwagi w żaden sposób nie umniejszają wartości poznawczej przedstawionej pracy, ani jej znaczenia w rozwoju immunoterapii. Można mieć nadzieję, że autorka będzie kontynuowała badania pogłębiające naszą wiedzę na temat różnych aspektów immunomodulacyjnego działania CSCs w etiopatogenezie NDRP.

W konkluzji wnioskuję do Rady Dyscypliny Nauk Medycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie mgr Agaty Raniszewskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Wnioskuję także do Wysokiej Rady o wyróżnienie pracy.


Artur Szlubowski