Uniwersytet Medyczny w Łodzi Al. Kościuszki 4, 90-419 Łódź	UNIWERSYTET MEDYCZNY W ŁODZI	Zakład Patologii Katedra Onkologii UMED Łódź ul. Pomorska 251, 92-213 Łódź tel. (42)272 56 01, fax. (42)272 56 04

Dr hab. n. med. Dorota Jesionek-Kupnicka
Prof. UMED w Łodzi
Zakład Patologii Katedry Onkologii
Wydział Lekarski
Uniwersytet Medyczny w Łodzi

Łódź, 17.09.2021

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Izabeli Popławskiej pt.: "Ocena czynników warunkujących utrzymanie mikrośrodowiska immunosupresyjnego przez komórki glejaka zarodkowego (glioblastoma)". Promotor: dr hab. n. med. Joanna Reszeć

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pani **mgr Izabeli Popławskiej** została przygotowana w Zakładzie Patomorfologii Lekarskiej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku.

Praca porusza niezwykle istotny problem regulacji ważnych hamujących punktów kontrolnych odpowiedzi immunologicznej - antygenu związanego z cytotoksycznymi limfocytami T4 (ang. CTLA-4, Cytotoxic T Cell Antigen 4) oraz białka programowanej śmierci komórki-1 (ang. PD-1, Programmed Death Receptor 1) należących do nadrodziny B7-1/B7-2-CD28, odgrywających kluczową rolę w mikrośrodowisku immunologicznym nowotworów (ang.TME, tumor microenvironment), w tym glejaków, szczególnie że ostatnie badania podkreślają ich rolę w kancerogenezie oraz w terapii. Białko powierzchniowe limfocytów T, CTLA-4/CD152 reguluje w dół układ odpornościowy, prowadząc do zahamowania aktywacji limfocytów T. Stymulacja CTLA-4 działa jako „wyłącznik" ataku komórek T na antygen w początkowej fazie odpowiedzi, głównie przez komórki naiwne. PD-1/ CD279 to białko błonowe wykazujące ekspresję na powierzchni aktywowanych limfocytów T, limfocytów B, komórek NK i makrofagów, negatywnie regulujące odpowiedź immunologiczną. Podczas gdy CTLA-4 działa we wczesnej aktywacji naiwnych komórek T w tkankach limfatycznych, PD-1 działa podczas fazy efektorowej aktywacji komórek T. Oddziaływanie PD-1 z jego ligandami zachodzi głównie w tkankach obwodowych, takich jak mikrośrodowisko guza, powodując apoptozę i regulację w dół funkcji efektorowej komórek T na poziomie doświadczalnym. Blokada oraz modulacja obu punktów kontrolnych jest ważna dla hamowania tolerancji immunologicznej przeciwko komórkom nowotworowym.

Immunoterapia, poprzez hamowanie immunologicznych punktów kontrolnych min. za pomocą terapeutycznych przeciwciał monoklonalnych ukierunkowanych na PD-1/CD279, jego ligand PD-L1/CD274 lub CTLA-4/ CD152 jest skuteczna w wielu litych i hematologicznych nowotworach złośliwych. Potencjał hamowania immunologicznego tych punktów wykazano także w badaniach klinicznych w strategii leczenia glejaków, z różnym powodzeniem min. u pacjentów z nawrotowym glejakiem (np. z użyciem niwolumabu (inhibitor anty-PD-1) i ipilimumabu (inhibitor CTLA-4), niezależnie od statusu ważnego predyktora jakim jest metylacja promotora genu *MGMT.* Co niezwykle interesujące, glejaki zarodkowe charakteryzują się brakiem lub niskim statusem biomarkerkerów korelujących z aktywnością immunoterapii tzn. z niskim obciążeniem mutacjami nowotworowymi (ang. TMB, tumor mutation burden) i brakiem silnego wyjściowego nacieku immunologicznego mikrośrodowiska guza (TME) oraz z sygnaturą interferonu-gamma (IFN-γ). Uwzględniając fakt, że ośrodkowy układ nerwowy jest często określany jako miejsce „uprzywilejowane immunologicznie" ze względu na obecność bariery krew-mózg, która chroni przed wejściem leków w tym przeciwciał z krążenia ogólnoustrojowego, lepsze poznanie mikrośrodowiska nowotworowego wydaje się szczególnie istotne, w celu jego modulowania.

Praca doktorska została wydana w formie oprawionego maszynopisu liczącego **122 stron**. Praca ma typowy układ stosowany w rozprawach doktorskich z podziałem na rozdziały: Wprowadzenie-podstawy teoretyczne min. obejmujący zagadnienia związane z funkcjami układu immunologicznego w kontekście nowotworzenia z omówieniem immunologicznych punktów kontrolnych i roli CTLA-4 oraz PD-1, apoptozy, interakcji układu immunologicznego i OUN, w tym cytokin i mikrogleju, charakterystyką nowotworów OUN, szczególnie glejowych; Założenia i cel pracy; Materiał i metodyka badań; Wyniki; Dyskusja; Wnioski; Streszczenie (w języku polskim i angielskim); Piśmiennictwo. Nie zamieszczono Spisu rycin i tabel oraz Listy zastosowanych skrótów. Praca zawiera **33 ryciny** w tym min. dokumentację uzyskanych wyników immunohistochemicznej ekspresji badanych białek w tkance nowotworowej oraz z badań *in vitro* wykresy obrazujące uzyskane wyniki, ponadto **3 tabele**, zawierające charakterystykę rodziny białek B7 z ich ligandami, charakterystyka pacjentów w odniesieniu do wieku, płci oraz stopnia złośliwości glejaków z podziałem na LGG (ang. low grade glioma) i HGG (ang. high grade glioma), wg WHO 2016, schemat hodowli *in vitro* przeprowadzonych eksperymentów na linii komórkowej glejaka, w obecności jednojądrzastych komórek krwi obwodowej (PBMC) oraz czynników blokujących immunologiczne punkty kontrolne. Piśmiennictwo obejmuje **233 pozycji literaturowych** anglojęzycznych pochodzących głównie z ostatnich kilku lat.

Cała rozprawa doktorska napisana jest w sposób zgodny z ogólnie przyjętymi zasadami. Wstęp stanowi szeroką analizę aktualnego stanu wiedzy na temat podjętego problemu badawczego uzasadniając celowość przeprowadzonych badań. Doktorantka w

sposób interesujący przedstawiła najnowsze dostępne dane literaturowe dotyczące skomplikowanych czynników etiopatogenetycznych i ich powiązania z regulacją immunologiczną w glejakach, w których główną rolę odgrywa supresyjne mikrośrodowisko guza (TME).

Założenia i cele podjętych badań zostały sformułowane w sposób poprawny.

Celem niniejszej pracy jest ocena ekspresji negatywnych punktów kontrolnych PD-1 oraz CTLA-4 w linii komórkowej ludzkiego glejaka zarodkowego *IDH* willdtype U-87 (ATCC) w różnych warunkach eksperymentalnych w obecności komórek jednojądrzastych z krwi obwodowej (PBMC, Peripheral blood mononuclear cells), pozyskanych od zdrowych ochotników. oraz czynników blokujących immunologiczne punkty kontrolne. Dodatkowo ocenie została poddana proliferacja, cykl komórkowy oraz żywotność komórek nowotworowych linii U-87. Ponadto, zbadane zostało wydzielanie cytokin przez komórki immunologiczne oraz poziom aktywacji tych komórek w warunkach in vitro bez blokowania oraz po zablokowaniu badanych immunologicznych punktów kontrolnych. Przeprowadzona została analiza cytometryczna zmian w fenotypie oraz statusie aktywacyjnym limfocytów z wykorzystaniem metody cytometrii przepływowej z przeciwciałami anty-CD4 FITC (klon RPA-T4), anty-CD8 PE (klon HIT8a), anty-CD25 PE-Cy5 (klon M-A251) (receptor dla IL-2), anty-CD127 AlexaFluor647 (klon HIL-7R-M21) (receptor dla IL-7). Analiza cytometryczna wykorzystująca użycie aneksyny V znakowanej fluorochromem i 7AAD pozwoliła na ocenę żywotności komórek nowotworowych w warunkach stymulacji z wyróżnieniem komórek żywych, wczesno- oraz późnoapoptotycznych oraz nekrotycznych. Ponadto, zbadany został profil stężenia cytokin IFN-γ, IL-6, TNF-α, IL-10, TGF-beta uwalnianych w kohodowli PBMC z komórkami nowotworowymi glejaka. Celem było również zbadanie immunoekspresji PD-1 oraz CTLA-4 w tkance nowotworowej 85 glejaków WHO GII *IDH1* mutant oraz WHO GIV (glioblastoma WT).

W rozdziale „Materiał i metody” opisano charakterystykę grupy badanej z uwzględnieniem zebranych cech histo-klinicznych, sposobu przygotowania materiału tkankowego z guzów mózgu, pozyskania i izolacji komórek jednojądrzastych z krwi obwodowej (PBMC) od zdrowych dobrowolnych dawców krwi, badania *in vitro* z wykorzystaniem ludzkiej linii komórkowej glejaka pierwotnego U-87 (ATCC) oraz immunohistochemicznych oznaczeń cytometrycznych i tkankowych z opisem procedury tych metod badawczych, charakterystyki przeciwciał, wzorców ekspresji, sposobu analizy oznaczanych antygenów.

Grupę badaną do oznaczeń tkankowych stanowił wyselekcjonowany archiwalny pooperacyjny materiał tkankowy utrwalony w formalinie zatopiony w parafinie (ang. FFPE Formalin-fixed paraffin-embedded), uzyskany drogą chirurgicznej biopsji otwartej w latach 2015-2019 w Klinice Neurochirurgii Uniwersyteckiego Szpitala Klinicznego w Białymstoku (zgoda Komisji Bioetycznej UMED w Białymstoku (nr R-I-002/181/2016) od 85 pacjentów (38

kobiet, 47 mężczyzn), w przedziale wiekowym 22-82 lata oraz średnią 55 lat: 60 pacjentów z Glioblastoma WHO GIV *IDH1* wildtype (WT) oraz 25 pacjentów z glejakami o niskim stopniu złośliwości (LGG, ang. low grade glioma) WHO GII *IDH1* mutant. Do dalszych analiz zostały włączone także dane kliniczne uwzględniające umiejscowienie guza z podziałem na płeć oraz stopień złośliwości nowotworu. Objętość guzów u poszczególnych pacjentów została obliczona z użyciem wzorów wg. wcześniejszych danych literaturowych: na objętość elipsoidy oraz wzoru skróconego w przypadku posiadania jedynie dwóch wymiarów. Zastosowane metody analizy statystycznej są adekwatne dla rozwiązania problemów badawczych.

Uzyskane wyniki zostały zaprezentowane głównie w postaci wykresów, diagramów oraz **tabel.**

Dyskusja jest napisana w sposób rzeczowy i uporządkowany, omawiający kolejne analizowane problemy badawcze. Wyniki uzyskane w ramach realizacji pracy doktorskiej zostały skonfrontowane z najnowszymi wynikami opublikowanych badań o podobnej tematyce i w pełni ukazuje znajomość aktualnej literatury Pani Izabeli Popławskiej dotyczącej omawianego zagadnienia.

Po analizie pracy nasuwa się kilka pytań oraz uwag:

1. Mutacja *IDH1* jest niezwykle ważnym biomarkerem klasyfikacyjnym glejaków. Chciałam podkreślić, że w najnowszej klasyfikacji WHO 2021 (CNS5), do której również odwołuje się Doktorantka („upgrate 2021"), Glioblastoma, *IDH mutant* klasyfikowane są jako glejaki (astrocytoma) WHO G4, zrezygnowano z terminu Glioblastoma *IDH* mutant. Obecnie jedyny typ to Glioblastoma, *IDH* wildtype. Dlatego też w części pracy dotyczącej tkanek FFPE nowotworów glejowych brak jest ważnej informacji dotyczącej oceny statusu mutacji *IDH1*- czy we wszystkich guzach była wykonywana mutacja *IDH1-R132H* czy też była to ocena immunohistochemiczna i ewentualnie w przypadkach negatywnej ekspresji stosowano molekularną ocenę mutacji.
2. W pracach korzystających z bazy danych TCGA (The Cancer Genome Atlas) oraz z bazy CGGA (Chinese Glioma Genome Atlas), poziom CTLA-4 i PD-1 korelował ze statusem mutacji *IDH1*: był znacznie wyższy w glejakach typu dzikiego *IDH1* niż w glejakach z mutacją *IDH1* co korelowało ze stopniem złośliwości. W dyskusji Autorka zresztą porusza ten wątek. Dlatego też nasuwa się uwaga, że bardziej adekwatną grupą porównawczą stanowiłaby linia komórkowa glejaków *IDH1* mutant, o ile jest ona dostępna. Natomiast w tkankowej analizie immunohistochemicznej zabrakło grupy kontrolnej tkanki mózgowej nienowotworowej.
3. W części dotyczącej oceny ekspresji PD-1 i CTLA-4 w materiale tkankowym z guzów mózgu LGG glioma WHO GII oraz HGG glioma (glioblastoma WHO GIV) nie podano, w jakich komórkach została oceniona ekspresja CTLA-4 oraz PD-1, jedynie przy ocenie PD-1 jest zaznaczona ekspresja w limfocytach.

4. W opisie metody immunohistochemicznej nie podano, na jakiej podstawie została zastosowana ocena ekspresji immunobarwienia CTLA-4 oraz PD1, którą oceniono jako brak, słabą i silną z punktami odcięcia 0% komórek oraz 50% (poniżej i powyżej) „Ekspresję oceniano półilościowo na podstawie intensywności barwienia przy użyciu skali: brak – 0; słabe i/lub widoczne w mniej niż 50% komórek – 1; silne lub widoczne w ponad 50% komórek", szczególnie że w dalszej analizie zostały uwzględnione jedynie wartości pozytywne i negatywne ekspresji barwienia immunohistochemicznego CTLA4, PD1 **(Rycina 7, 12)**. Nie jest jasne, dlaczego i kiedy Doktorantka przedstawia wyniki jako poziom, a kiedy jako intensywność ekspresji cząsteczek (**Rycina 9,10, 13,15,16)** oraz dlaczego w wykresach jest mowa o intensywności/poziomie fluorescencyjnym cząsteczek (**Rycina 10, 15, 16, 17),** skoro ta metoda barwienia nie była stosowana na tkankach FFPE z guzów glejowych.
5. Wyniki pracy przedstawione są głównie w formie wykresów, natomiast nie podano wartości liczbowych uzyskanych wyników, niestety zamieszczone wykresy są mało czytelne.
6. We wnioskach doktorantka pisze o odsetkowych zmianach w **limfocytach efektorowych i regulatorowych,** natomiast nie jest jasne, w jaki sposób te limfocyty zostały scharakteryzowane. W rozdziale „Materiały i Metodyka" na str. 54 zostało użyte sformułowanie dotyczące limfocytów CD4+: „domniemane limfocyty T regulatorowe charakteryzują się ekspresją (CD25+CD127-)", natomiast w dyskusji dla komórek regulatorowych użyty jest fenotyp CD4+CD25-CD127+, CD4+CD25-CD127-. Nie podano charakterystyki fenotypowej komórek efektorowych.

Ponadto z obowiązku recenzenta pragnę zwrócić uwagę na inne niedoskonałości manuskryptu:

- Nazwy genów powinny być pisane skośnie czcionką Italic w przeciwieństwie do białek
- Niezrozumiałe jest zdanie w Rozdziale 3. „Materiał i metodyka" ze strony 56 „Kontrolą niezbędną do ustalenia bramki na komórkach proliferujących dane uzyskane z komórek poddanych działaniu kolcemidu zatrzymującego podziały komórkowe".
- W **Rycinie 1.** brak jest odniesienia do źródła, z którego Autorka ewentualnie korzystała, czy jest to rycina całkowicie autorska, czy też Doktorantka wykonała ją na podstawie istniejącego schematu
- W **Rycinie 15.** zamiast stopnia zaawansowania nowotworu powinno być stopnia złośliwości**: „**Zależność poziomu ekspresji cząsteczki PD-1 od płci oraz stopnia zaawansowania nowotworu (II - LGG, IV- HGG)"
- W **Rycinie 26.** brak jest podpisów a, b, c, pomimo że w tekście są odwołania do **Ryciny 26 a, 26 b, 26 c.**

- Błędne podanie piśmiennictwa na str. 49 **[189+]** zamiast [189], z kolei w pozycji piśmienniczej **[22]** nie podano pełnych danych literaturowych: Want, Y., Dia, Y., & Lu, Z. (2018). Metabolic features of cancer cells.

Podsumowując, pomimo niedostatków manuskryptu **pozytywnie oceniam** wartość naukową przedstawionej pracy doktorskiej, podjęty temat jest niezwykle istotny, eksperymenty zostały zaprojektowane i przeprowadzone prawidłowo, uzyskane wyniki odzwierciedlają założenia i cele pracy. Pomimo tego, że Doktorantka nie ustrzegła się błędów edytorskich, niniejsza praca doktorska wskazuje na dobre przygotowanie teoretyczne Autorki oraz opanowanie przez nią warsztatu badawczego i umiejętności krytycznej analizy uzyskanych wyników w sposób zadawalający. Przedstawiona do oceny praca doktorska pt.: **"Ocena czynników warunkujących utrzymanie mikrośrodowiska immunosupresyjnego przez komórki glejaka zarodkowego (glioblastoma)" spełnia wszystkie wymagania stawiane rozprawom doktorskim**, zgodnie z podstawą prawną art.13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 z późn. zm.) oraz 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.), dlatego wnoszę do **Senatu Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku o dopuszczenie Pani Izabeli Popławskiej** do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Dr hab. n. med. Prof. UMED w Łodzi
Dorota Jesionek-Kupnicka