



UNIwersYTET MEDYCZNY

IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH WE WROCLAWIU

Katedra oraz Zakład Patomorfologii i Cytologii Onkologicznej
ul. Borowska 213, 50-556 Wrocław

Wrocław, 02.12.2019

dr hab. n. med. Piotr Donizy

Katedra oraz Zakład Patomorfologii i Cytologii Onkologicznej

Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu

Tel.: 717343964

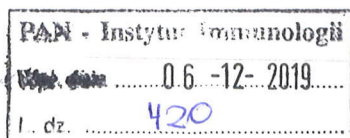
E-mail: piotr.donizy@umed.wroc.pl

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr inż. Bożeny Ścirki pt. *Zróznicowanie repertuaru receptorów antygenowych limfocytów T (TCR) w przebiegu eksperymentalnej immunoterapii czerniaka B16 przeciwciałem anti-GITR*

Czerniak skóry należy do najbardziej agresywnych nowotworów złośliwych człowieka. W początkowych fazach rozwoju choroby jedyną stosowaną metodą leczenia jest radykalne usunięcie zmiany z szerokim marginesem chirurgicznym skóry niezmienionej. W przypadku rozsiewu choroby, standardowe metody leczenia, takie jak chemioterapia i radioterapia są zazwyczaj częścią leczenia paliatywnego, które ogniskuje się głównie na wydłużeniu czasu przeżycia przy zachowaniu odpowiedniej jakości życia pacjentów. Olbrzymie nadzieje dla pacjentów z rozsiałym czerniakiem pokładane są w immunoterapii, której dotychczasowe osiągnięcia zrewolucjonizowały współczesną terapię tego nowotworu, istotnie poprawiając wyniki leczenia (m. in. inhibitory osi PD1/PD-L1). Bazując m.in. na stymulacji bądź blokadzie cząsteczek powierzchniowych stanowiących punkty kontrolne układu odpornościowego indukują i/lub wzmacniają one odpowiedź immunologiczną, która niszczy komórki nowotworowe. Do takich cząsteczek należy receptor GITR (*glucocorticoid-induced TNFR-related protein*, CD357), który jest transbłonowym białkiem należącym do rodziny TNF. Badania *in vitro* i *in vivo* wskazują, że jednoczesna stymulacja cząsteczek GITR i receptorów dla antygeny (TCR) powoduje zahamowanie supresorowej funkcji limfocytów T regulatorowych i wpływa na aktywację limfocytów efektorowych. W przedstawionej mi do oceny rozprawie Doktorantka badała efekt przeciwnowotworowy podania przeciwciała DTA-1 (anty-GITR) w mysim modelu czerniaka.

Podjęta przez Doktorantkę tematyka jest wysoce uzasadniona i znakomicie plasuje się we współczesnych nurtach badawczych dotyczących czerniaka.

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska mgr inż. Bożeny Ścirki jest niezwykle ciekawym studium eksperymentalno-immunologicznym, w którym podjęto próbę wyjaśnienia wpływu przeciwciała anti-GITR na zmiany repertuaru receptorów antygenowych limfocytów T w obrębie guza oraz w regionalnych i obwodowych węzłach chłonnych.



Donizy

Rozprawa doktorska mgr inż. Bożeny Ścirki jest poprawnie skonstruowana i ma prawidłowy układ rozdziałów. Całość tekstu liczy 136 stron. Tabele są prawidłowo zlokalizowane w tekście i czytelne, a ryciny i zdjęcia doskonałej jakości. Standardowe części pracy (streszczenie w języku polskim i angielskim, cele pracy, materiał i metody, wyniki oraz dyskusja i wnioski) są prawidłowo przygotowane. Uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej na przeprowadzenie eksperymentów z wykorzystaniem zwierząt laboratoryjnych.

Wstęp jest rzeczowy i syntetyczny. Autorka w sposób kompetentny omawia najistotniejsze zagadnienia szeroko pojętej immunologii ogólnej i immuno-onkologii oraz przybliży czytelnikowi główne założenia i dotychczasowe wyniki badań dotyczących różnorodnych form immunoterapii czerniaka. Ta część pracy świadczy o dużej umiejętności Doktorantki rzeczowego i klarownego podejścia do jakże szerokiej i trudnej tematyki badawczej.

Cele pracy przedstawione zostały precyzyjnie i klarownie, a ich główne założenia zawierają się w konkludującej sentencji dotyczącej oceny różnorodności repertuaru receptorów antygenowych limfocytów T (TCR) w trakcie przebiegu eksperymentalnej immunoterapii mysiego czerniaka B16 za pomocą przeciwciała anti-GITR (DTA-1) oraz próby odpowiedzi na pytanie czy stymulacja poprzez receptor GITR prowadzi do selektywnej ekspansji, konwersji czy zaniku populacji komórek efektorowych i supresorowych.

Na uwagę zasługują niezwykle bogaty, detalicznie przygotowany rozdział **Materiał i Metody**, co świadczy o olbrzymim nakładzie pracy Doktorantki, jaki został włożony w przygotowanie powyższej rozprawy oraz o dużych umiejętnościach badawczo-analitycznych mgr inż. Bożeny Ścirki.

Rozdział **Wyniki** jest napisany w sposób bardzo przejrzysty i czytelny. Duża ilość właściwie przygotowanych tabel i rycin ułatwia interpretację niezwykle bogatych i złożonych rezultatów badań składających się na rozprawę doktorską. Całość rozdziału stanowi dowód doskonale zaplanowanych i precyzyjnie wykonanych analiz opierających się w dużej części o unikatowe modele immuno-onkologiczne z wykorzystaniem najnowocześniejszych metod immunologii i biologii molekularnej.

W rozdziale **Dyskusja** Doktorantka właściwie porównała wyniki swoich analiz z rezultatami innych grup badawczych zajmujących się zbliżonymi zagadnieniami. Wyczerpująco, z naukową dojrzałością przeanalizowała wszystkie uzyskane wyniki, opatrując je ważnymi i wiele wnoszącymi do akademickiej dyskusji komentarzami. Na podkreślenie zasługuje właściwy krytycyzm w interpretacji uzyskanych wyników wraz odniesieniami do elementów eksperymentów, które przysporzyły największej trudności w ich realizacji lub nie zostały wykonane.

We **Wnioskach** Doktorantka podsumowując całość pracy badawczej przedstawia 4 główne konkluzje: (1) jednokrotne podanie przeciwciała DTA-1 wpływa na zahamowanie wzrostu czerniaka w mysim modelu badawczym oraz wzmacnia efektorową odpowiedź limfocytów T, jednocześnie zaburzając akumulację limfocytów regulatorowych w obrębie guza; (2) analiza repertuaru receptorów TCR limfocytów T CD4⁺ wykazała, że dominujące klonów limfocytów T efektorowych reaktywnych wobec komórek nowotworowych posiadają podobną częstość zarówno u myszy leczonych, jak i nieleczonych przeciwciałem DTA-1; (3) zarówno obwodowy repertuar receptorów TCR limfocytów T regulatorowych, jak i ten związany z Treg w obrębie guza, przechodzą związaną z podaniem DTA-1 immunoedycję, która charakteryzuje się deplecją dominujących klonów oraz pojawieniem się bardziej zróżnicowanych klonów o niskiej częstotliwości, które w znacznym stopniu współdzielą receptory TCR z limfocytami T efektorowymi; (4) przeciwciała DTA-1 eliminuje aktywowane limfocyty T regulatorowe w obrębie guza, które są zaangażowane w utrzymanie tolerancji wobec komórek nowotworowych, faworyzując przy tym rozplam i rekrutację obwodowych limfocytów T regulatorowych, które mogą w przyszłości stanowić populację limfocytów wewnątrzguzowych, które będą zdolne do konkurowania z limfocytami efektorowymi o rozpoznanie tych samych antygenów nowotworowych. W mojej opinii jest to niezwykle cenny wniosek, który stanowi ważny głos w dyskusji nad potencjalnymi mechanizmami oporności na zastosowane leczenie anti-GITR.

Janina

Należy uwypuklić fakt, że badania oparto na unikalnym modelu myszy TCR^{miniFoxP3}GFP, których różnorodność receptorów TCR została ograniczona w celu umożliwienia monitorowania zmian w ich repertuarze na poziomie pojedynczych, funkcjonalnie odrębnych klonów swoistych dla antygenów nowotworowych. Dzięki temu możliwe było precyzyjne scharakteryzowanie repertuarów receptorów TCR w obrębie różnych subpopulacji limfocytów zaangażowanych w odpowiedź przeciwnowotworową. Niezwykle wartościowe jest także wykorzystanie jako nowotworu modelowego mysiej linii czerniaka B16, zmodyfikowanej genetycznie do ekspresji neoantygeny (peptyd Ep63K).

Na podkreślenie zasługuje fakt, że w wyniku realizacji niniejszej rozprawy doktorskiej powstała publikacja: Bożena Scirka, Edyta Szurek, Maciej Pietrzak, Grzegorz Rempala, Paweł Kisielow, Leszek Ignatowicz, Arkadiusz Miazek. *Anti-GITR Antibody Treatment Increases TCR Repertoire Diversity of Regulatory but not Effector T Cells Engaged in the Immune Response Against B16 Melanoma*. Arch Immunol Ther Exp (Warsz). 2017;65(6):553-564.

Szczegółowa lektura rozprawy doktorskiej pozwoliła wykryć pojedyncze niedociągnięcia językowe, które nie wpływają na wysoką merytoryczną ocenę i nie umniejszają istotnych osiągnięć pracy:

- Str.13.: „...pojawienie się zmian nowotworowych w innych organach **zmniejsza** rokowanie...”. Bardziej poprawnie brzmi: obecność zmian przerzutowych **pogarsza** rokowanie.
- Str.36.: „...im intensywniejsze uwalnianie TAA przez guz, tym silniejsza korelacja z jego **uzłośliwieniem**...”. Bardziej poprawne wydaje się być zastąpienie słowa „uzłośliwienie” sformułowaniem: wyższy stopień histologicznej złośliwości (jeśli mamy na myśli obraz histopatologiczny nowotworu) lub bardziej agresywnym przebiegiem klinicznym/wyższym stopniem zaawansowania klinicznego nowotworu.
- Str.49.: „...leczenie agonistycznym przeciwciałem anti-GITR indukuje **odrzućenie** wysoce immunogennych guzów...”. Bardziej poprawnym z punktu widzenia nomenklatury medycznej jest sformułowanie: niszczenie lub całkowita eliminacja wysoce immunogennych guzów. „Odrzucanie” jest raczej zarezerwowane dla transplantologii klinicznej.
- Str. 52.: „...wobec antygenów nowotworowych z **melanomy**...”; „...**hybrydomę** otrzymano...”; „...fuzja z **tymomą**...”. Sugeruję niestosowanie reguł polskiej deklinacji wobec rzeczowników obcych, w szczególności łacińskich.
- Str.63.: „...**tymoma**...”. Powinno być: thymoma.
- Str.65.: „...pomiar guza wykonywano **przeżyciowo**...”. Powinno być: przyżyciowo.

Z obowiązku recenzenta zmuszony jestem wskazać na pojedynczą niezręczność i niekonsekwencję nomenklaturową stosowaną przez Doktorantkę w kontekście węzłów chłonnych, których ocena histopatologiczna ma kluczowe znaczenie dla określenia rokowania i wdrożenia ewentualnego dalszego leczenia u pacjentów z czerniakiem skóry. W podrozdziale dotyczącym metod pozyskiwania limfocytów T na str.66 pojawiają się skróty cLN, jako odległe węzły chłonne oraz dLN, jako węzły chłonne strażnicze. Należy uwypuklić fakt, że w piśmiennictwie medycznym stosowane jest pojęcie węzłów chłonnych **wartowniczych**, a nie strażniczych. Na str.89 pojawiają się z kolei skróty: pLN oraz dLN, które zostały określone jako: obwodowe węzły chłonne (pLN) oraz drenujące węzły chłonne (dLN). Rozumiem, że powyższe określenia stanowiły swoiste skróty myślowe i Doktorantka badała regionalne węzły chłonne (te w pobliżu guza pierwotnego) oraz obwodowe węzły chłonne (niezwiązane lokalizacyjnie z guzem pierwotnym). W kontekście przedstawionych opisów metod laboratoryjnych nieuzasadnione jest stosowanie terminu „węzły chłonne wartownicze”, ponieważ z klinicznego punktu widzenia mają one ściśle określoną definicję (ich poszukiwanie wiąże się m.in. z podaniem radioaktywnego znacznika i ich następową lokalizacją za pomocą gammakamery).

PODSUMOWANIE

Po wnikliwej lekturze rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Bożeny Ścirki oceniam ją bardzo wysoko. Jest to samodzielne, obszerne opracowanie niezwykle złożonego materiału badawczego przy użyciu nowoczesnych metod posiadające aspekt nowości oraz niekwestionowany wymiar praktyczny. Autorka dowiodła, że jest w pełni dojrzałym pracownikiem naukowym, który potrafi nie tylko właściwie planować i przeprowadzać eksperymenty naukowe, ale co najważniejsze wyciągać właściwe wnioski na podstawie rzetelnej, popartej odpowiednimi narzędziami statystycznymi analizie uzyskanych wyników.

Biorąc pod uwagę powyższe stwierdzam, że oceniana rozprawa doktorska mgr inż. Bożeny Ścirki pt. „Zróżnicowanie repertuaru receptorów antygenowych limfocytów T (TCR) w przebiegu eksperymentalnej immunoterapii czerniaka B16 przeciwciałem anti-GITR” w pełni spełnia kryteria przypisane rozprawom na stopień naukowy doktora przez Ustawę o Stopniach Naukowych i Tytule Naukowym i z pełnym przekonaniem zwracam się do Rady Naukowej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu o dopuszczenie Pani mgr inż. Bożeny Ścirki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie ze względu na wybitne walory merytoryczne pracy i jej szczególną wartość badawczo-kliniczną wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Immunologii i i Terapii Doświadczalnej o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr inż. Bożeny Ścirki.

Z wyrazami szacunku
dr hab. n. med. Piotr Donizy

