



Warszawa, dn. 05.04.2024

RECENZJA
rozprawy doktorskiej lek. Macieja Łuby
pt. „ZNACZENIE EKSPRESJI LIGANDU PD-L1 ORAZ NACIEKU
LIMFOCYTARNEGO W OCENIE ROKOWANIA RAKA
NERKOWOKOMÓRKOWEGO”

Recenzję rozprawy doktorskiej pt. *„Znaczenie ekspresji ligandu PD-L1 oraz nacieku limfocytarnego w ocenie rokowania raka nerkowokomórkowego”* autorstwa lek. Macieja Łuby przygotowano w odpowiedzi na pismo Pana prof. dr hab. Zbigniewa Noweckiego, Koordynatora ds. przewodów doktorskich Rady Naukowej Narodowego Instytutu Onkologii Państwowego Instytutu Badawczego im. Marii Skłodowskiej-Curie w Warszawie, z dnia 08.02.2024 r.

Promotorem pracy jest Pan dr hab. n. med. Paweł Wiechno, prof. Instytutu, a Promotorem pomocniczym Pani dr n. biol. Natalia Rusetska. Badania zostały wykonane w Zakładzie Immunoterapii Eksperymentalnej Narodowego Instytutu Onkologii Państwowego Instytutu Badawczego im. Marii Skłodowskiej-Curie w Warszawie, kierowanym przez Panią dr hab. Elżbietę Sarnowską, prof. Instytutu.

Lek. Maciej Łuba ukończył Wydział Lekarski w Warszawskim Uniwersytecie Medycznym. Uzyskał tytuł specjalisty z zakresu urologii i z sukcesami pogłębia wiedzę w zakresie urologii klinicznej, co potwierdzają liczne certyfikaty, w tym międzynarodowe. Doktorant jest również aktywny na polu naukowym, czego dowodzi m.in. współautorstwo pracy oryginalnej opublikowanej w *American Journal of Cancer Research* o wskaźnikach IF = 5.942 i 100 pkt MNiSW.

Formalna ocena pracy

Manuskrypt obejmuje 85 stron i został napisany w języku polskim. Rozprawa zawiera wszystkie elementy typowe dla pracy doktorskiej, tj.: spis skrótów, spis treści, streszczenia w języku polskim i angielskim, wprowadzenie, cel, metodologię, wyniki i ich



omówienie. Układ pracy jest logiczny i przejrzysty. Do rozprawy zostały włączone wnioski oraz bibliografia, spis rysunków i tabel. Wyodrębnione zostały podrozdziały, co pozwala sprawnie poruszać się w obrębie szerokiego zakresu przedstawionych w rozprawie zagadnień badawczych. Dysertacja spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim.

Wartość naukowa i merytoryczna rozprawy

Choroby nowotworowe stanowią obecnie istotny problem kliniczny i społeczny. Wśród nowotworów źle rokujących, o agresywnym przebiegu i niekorzystnym rokowaniu wyróżnia się rak nerkowokomórkowy (RCC), stanowiący ~2% wszystkich diagnozowanych nowotworów złośliwych. RCC to najczęstszy nowotwór złośliwy nerki, a najczęściej diagnozowanym jego podtypem jest rak jasnokomórkowy nerki (ccRCC), który charakteryzuje się największym odsetkiem obecności inwazji miejscowej, przerzutów oraz najwyższą śmiertelnością. Ostatnie dekady przyniosły nowe obiecujące narzędzia terapeutyczne oparte o specyficzne inhibitory oraz przeciwciała zdolne do zaburzenia/przeprogramowania kluczowych szlaków sygnałowych w komórce rakowej w celu jej inaktywacji. Dodatkowo, wciąż poszukuje się nowych bardziej miarodajnych markerów prognostycznych, które pozwoliłyby na wczesne wdrożenie celowanych terapii. Jednak wciąż nie odnotowano przełomu, który skutkowałby istotnym wzrostem wyleczeń pacjentów z RCC. Jednym z powodów braku skutecznych terapii jest skomplikowana i wciąż słabo zbadana biologia komórek guza, zwłaszcza w kontekście oddziaływania ich z komórkami mikrośrodowiska.

Kandydat w swoich badaniach podjął się analizy ekspresji ligandu programowanej śmierci-1 (PDL-1) na komórkach nowotworowych i powiązania poziomów ekspresji PDL-1 z liczbą i rodzajem limfocytów T stanowiących mikrośrodowisko guza ccRCC. PD-L1 jest cząsteczką pełniącą funkcję immunoregulacyjną i jej ekspresja jest indukowana przez substancje prozapalne w wielu typach komórek w całym organizmie, w tym w badanym



raku. Przyjmuje się, że związanie PD-L1 z receptorem PD-1 zapobiega nadmiernemu niszczeniu tkanek podczas stanów zapalnych. Wykazano, że wybrane nowotwory z PD-L1 na powierzchni komórek unikają ataku komponentów układu immunologicznego. Dlatego prowadzone badania nad ścieżką PD-1/PD-L1 i narzędziami do immunoterapii opartymi o przeciwciała anty-PD-L1 są obiecujące.

W mojej ocenie przedstawione w pracy analizy i wyniki są nowatorskie, ponieważ dotychczas nie dokonano tak kompleksowej analizy limfocytów CD4 i CD8 oraz PD-L1 w materiale klinicznym, tj. próbkach tkanek z pierwotnego guza ccRCC w odniesieniu do danych klinicznych pacjentów. Wysoko oceniam wartość naukową i merytoryczną podrozdziałów. Wstęp jest wyczerpujący i doskonale wprowadza czytelnika w tematykę prowadzonych badań. Opatrzony jest 3 rycinami oraz 6 tabelami. Szeroko została opisana klasyfikacja guzów nerek, diagnostyka i leczenie. Zostały uwzględnione najnowsze metody terapeutyczne oparte o inhibitory kinaz oraz przeciwciała. Ważną częścią wstępu jest charakterystyka molekularnego podłoża powstawania i rozwoju ccRCC i mutacji, które występują w ccRCC. Omówiona została rola utraty białka VHL, czy mutacji w genie *PBRM1* kodującym białko BAF180 kompleksu remodelującego chromatynę typu SWI/SNF oraz inne czynniki molekularne. Przedstawione we wstępie informacje oparte są na bogatej literaturze (tylko w tej części Kandydat powołał się na blisko 80 publikacji).

Materiały i metody są jasno opisane. Głównymi narzędziami były techniki immunochemiczne oraz analizy bioinformatyczne. Materiał stanowiły preparaty histopatologiczne archiwalne, na które składały się tkanki pozyskane od: 60 pacjentów z chorobą pierwotnie ograniczoną do narządu, u których w co najmniej 5-letniej obserwacji nie doszło do rozsiewu; 49 pacjentów z chorobą pierwotnie ograniczoną do narządu, u których w co najmniej 5-letniej obserwacji doszło do rozsiewu; 52 pacjentów z chorobą pierwotnie uogólnioną. Uzyskano odpowiednią zgodę Komisji Bioetycznej Narodowego Instytutu Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie w Warszawie. Doktorant szczegółowo opisał procedurę odparafinowania tkanek. Zwraca uwagę zastosowanie w analizie



oprogramowania statystycznego R, baz danych TCGA Gene Expression oraz Omnibus database. Testy użyte do oceny istotności statystycznej zostały odpowiednio dobrane i przeprowadzone.

Cel pracy został jasno i prawidłowo określony. Doktorant podjął się oceny znaczenia rokowniczego markerów stanu immunologicznego na przebieg ccRCC, w tym: (i) ekspresji ligandu PD-L1, (ii) nacieku limfocytów T CD4 i CD8 w mikrośrodowisku guza. Otrzymane wyniki powiązał z danymi klinicznymi i patologicznymi w odniesieniu do przynależności do grupy i przeżycia całkowitego pacjentów. Dodatkowo przeprowadził analizę wpływu mutacji w genie *PBRM1* na nacieki limfocytów T w ccRCC oraz zbadał zmiany w zakresie poziomu płytek krwi i stosunku liczby neutrofili do limfocytów.

Uzyskane dane zostały zaprezentowane na czytelnych wykresach i w formie tabel, a analizy immunocytochemiczne pokazane zostały również w formie zdjęć. Wyniki odniesiono do danych literaturowych w sekwencji odpowiadającej celom.

Kandydat wykorzystując dostępne bazy danych dokonał analizy ekspresji PD-L1 oraz CD4 i CD8A. Wykazał istotną nadekspresję obu CD (4 i CD8A) oraz CD274, kodującego PD-L1. Dane te świadczą o występowaniu nacieku limfocytów T w mikrośrodowisku guza, a zwiększony poziom ekspresji CD8A koreluje z gorszym przeżyciem pacjentów z ccRCC. Zgadzam się z Doktorantem, że na tej podstawie można przyjąć, że duża ilość limfocytów T CD8 w guzie może być rozpatrywana jako negatywny czynnik rokowniczy.

W materiale pobranym od pacjentów z ccRCC Kandydat badał nacieki limfocytów T w mikrośrodowisku guza i zaobserwował większy odsetek limfocytów T CD4 niż CD8, niezależnie od badanej grupy pacjentów. Co ciekawe, ekspresja CD4 była niezależna od mutacji w genie *PBRM1*. Kolejnym interesującym wynikiem było wykazanie, że w rejonach guza o wysokiej ekspresji *RRM2*, kluczowego enzymu w procesie syntezy DNA, występuje nacieki limfocytów T CD4.

Zaobserwował również, że w grupie pacjentów z pierwotnie rozsianą chorobą, PD-



L1 lokalizuje się w jądrach komórek ccRCC, co wskazuje, że PD-L1 może pełnić inną funkcję niż immunosupresyjna. Zaproponował, że: ilość limfocytów T (głównie CD8), jądrowa lokalizacja PD-L1 oraz wzrost ilości płytek krwi w krwi obwodowej pacjenta, potencjalnie mają wpływ na zaawansowanie choroby. Doktorant krytycznie omówił wyniki i prawidłowo je zinterpretował odnosząc się do danych literaturowych. Wnioski zostały poprawnie sformułowane i odnoszą się do wcześniej postawionych celów badawczych oraz uzyskanych wyników. Opis i interpretacja danych świadczą o tym, że Doktorant posiadał wysokie umiejętności oraz wiedzę, i prezentuje dojrzałość naukową oczekiwaną od osób z tytułem doktora.

Poprawność redakcyjna rozprawy

Praca jest napisana poprawnym językiem, z zachowaniem adekwatnej terminologii. Wysoko oceniam układ pracy, styl oraz przygotowane grafiki i tabele. Błędy edytorskie są nieliczne (np. na str. 43 brak jest odstępu pomiędzy liczbami, a skrótem „min.”). Na Rys. 11 (str. 53) nie oznaczono zdjęć symbolami A do F.

Uwagi i pytania

Przedstawione uwagi i pytania nie wpływają na moją bardzo wysoką ocenę rozprawy. Prosiłbym Doktoranta o odniesienie się do zawartych poniżej komentarzy i pytań:

1. We wstępie wskazane są trzy najczęstsze podtypy raka nerkowokomórkowego: rak jasnokomórkowy, rak brodawkowaty i rak chromofobowy, przy czym omówiony został tylko rak jasnokomórkowy. Poprosiłbym o krótką charakterystykę pozostałych dwóch podtypów RCC.

2. Mężczyźni chorują na RCC dwa razy częściej niż kobiety. Czy zdaniem Doktoranta płeć może mieć znaczenie w kontekście przeprowadzonych analiz?



Ocena końcowa

Uważam, że lek. Maciej Łuba zrealizował postawione cele, a opracowanie rozprawy doktorskiej świadczy o bardzo dobrym opanowaniu przez Doktoranta wiedzy z zakresu biologii ccRCC, jak i warsztatu badawczego. Forma i naukowa wartość otrzymanych wyników oraz ich częściowe opublikowanie świadczą, że Pan lek. Maciej Łuba jest przygotowany do dalszego prowadzenia prac badawczych. Przeprowadzone badania pozwoliły na pozyskanie nowej wiedzy służącej poznaniu czynników molekularnych będących podstawą oddziaływania komórek rakowych z komórkami mikrośrodowiska.

Stwierdzam, że recenzowana rozprawa doktorska lek. Maciej Łuby spełnia warunki określone w art. 13.1 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. zmianami) i wnioskuję do Wysockiej Rady Naukowej Narodowego Instytutu Onkologii Państwowego Instytutu Badawczego im. Marii Skłodowskiej-Curie w Warszawie o dopuszczenie lek. Macieja Łuby do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Wniosek o wyróżnienie

Uzyskane przez lek. Macieja Łubę wyniki mają charakter nowatorski i stanowią istotny wkład w badania nad zdefiniowaniem nowych biomarkerów, czy celów terapii ukierunkowanej. Biorąc pod uwagę wysoki poziom merytoryczny pracy, formę i naukową wartość oraz częściowe opublikowanie prezentowanych wyników zwracam się do Rady Naukowej Narodowego Instytutu Onkologii Państwowego Instytutu Badawczego im. Marii Skłodowskiej-Curie w Warszawie o wyróżnienie rozprawy doktorskiej.