



KATEDRA I KLINIKA UROLOGII OGÓLNEJ, ONKOLOGICZNEJ I CZYNNOŚCIOWEJ

Kierownik Katedry i Kliniki: prof. Piotr Radziszewski

Warszawa, 06.03.2024

Recenzja pracy na stopień dr n. med.

lekarza Macieja Łuby

pt.: „Znaczenie ekspresji ligandu PD-L1 oraz nacieku limfocytarnego w ocenie rokowania raka nerkowokomórkowego”

Rak nerkowokomórkowy (RCC) obejmuje > 10 podtypów histologicznych i molekularnych, z których najczęstszy jest jasnokomórkowy RCC (ccRCC), odpowiadający za najwięcej zgonów związanych z tym nowotworem. RCC ograniczony do narządu można skutecznie leczyć chirurgicznie, zaś sam nowotwór wykazuje jednocześnie silną oporność na konwencjonalną chemioterapię w przypadku wystąpienia przerzutów. Jesteśmy świadkami przełomu w leczeniu systemowym dzięki zastosowaniu leków antyangiogennych i immunoterapii, które kształtują współcześnie krajobraz leczenia przerzutowego RCC. Wreszcie, inhibitory immunologicznych punktów kontroli zmieniły sposób postępowania w przypadku zaawansowanego miejscowo ccRCC, poszerzając strategię leczenia w wybranych przypadkach o leczenie adjuwantowe po chirurgicznym leczeniu radykalnym. W szczególności przeciwciała monoklonalne skierowane przeciwko ligandowi programowanej śmierci 1 (PD-L1 czyli CD279) w połączeniu z antygenem 4 związanym z limfocytom cytotoksycznym T (CTLA-4 czyli CD152) lub z inhibitorami kinazy tyrozynowej (TKI) pozwoliły osiągnąć znaczną poprawę przeżycia chorych. Do innych interesujących przykładów receptorów immunologicznych punktów kontroli należą obok wspomnianych powyżej także białka VISTA, LAG-3 czy TIM-3, nad wykorzystaniem których w immunoterapii RCC toczą się już prace. Obciążenie mutacyjne guza, nacieki limfocytów T CD8+ lub profile ekspresji genów mogą stanowić alternatywne biomarkery odpowiedzi, umożliwiające lepszy dobór osób do określonych terapii i optymalizację wyników leczenia tej choroby. Warto zauważyć, że spośród 19 typów nowotworów ocenionych przez The Cancer Genome Atlas (TCGA), przełomowy program genomiki nowotworów, RCC ma najwyższy wynik nacieku limfocytów T. Zaawansowany RCC wiąże się również ze wzrostem nacieku limfocytów T pomocniczych 2 (Th2) i komórek T regulatorowych (Tregs). Odkrycia te potwierdzają znaczenie podejścia opartego na immunoterapii w RCC.

Leki immunoterapeutyczne, takie jak inhibitory immunologicznych punktów kontroli, pośrednio eliminują komórki nowotworowe poprzez modyfikację mikrośrodowiska nowotworu i/lub efektorowych komórek odpornościowych. Stwierdzono, że obecność PD-L1 na tkance nowotworowej nie jest warunkiem uzyskania odpowiedzi na leczenie, a wręcz

wysoka ekspresja PD-L1 jest negatywnym czynnikiem prognostycznym w przerzutowym RCC. Wybrane badania wykazały z kolei, że nadekspresja PD-L1 w komórkach odpornościowych naciekających guz, tzw. tumor infiltrating lymphocytes (TILs) lub szerzej tumor-associated immune cells (TAICs), jest powiązana z większym odsetkiem odpowiedzi w przypadku zastosowania inhibitorów immunologicznych punktów kontroli w różnych guzach litych, w tym przerzutowym RCC.

Pomimo licznych wysiłków mających na celu identyfikację markerów predykcyjnych, żaden z badanych nie okazał się na tyle skuteczny, aby można go było wdrożyć w praktyce klinicznej u pacjentów z RCC. Ponadto, większość aktualnych prób klinicznych nie została opracowana w oparciu o biomarkery predykcyjne. Stąd nie do końca wiadomo, które podgrupy pacjentów odniosą największe korzyści w przypadku zastosowania różnych kombinacji. Fakt ten uwypukla obecny brak spersonalizowanej terapii w RCC. W tym kontekście każda próba opracowania modelu prognostycznego ccRCC zasługuje na szczególną uwagę, zwłaszcza w przededniu rewolucji leczenia systemowego u pacjentów z ccRCC. Tematyka podjęta przez autora jest w ocenie recenzenta nie tylko aktualna, ale szalenie ważna w kontekście nowych dostępnych form leczenia tej choroby.

W pierwszej części recenzji należy stwierdzić, że omawiana rozprawa doktorska pt.: *„Znaczenie ekspresji ligandu PD-L1 oraz nacieku limfocytarnego w ocenie rokowania raka nerkowokomórkowego”*, prezentuje wymaganą ogólną wiedzę teoretyczną osoby ubiegającej się o nadanie stopnia doktora w dziedzinie *medycyna*. W obszernym wstępie Autor omówił epidemiologię, etiopatogenezę, klasyfikację RCC oraz dokonał szczegółowego przeglądu dostępnych metod leczenia według podziału względem stopnia zaawansowania choroby. Osobny podrozdział poświęcony został markerom molekularnym, w tym genom *BAP1*, *PBRM1* oraz *SETD2*, a także szlakowi PD-1/PD-L1 oraz dostępnym modelom prognostycznym. Ten ostatni podrozdział stanowi punkt wyjścia do sformułowania celów rozprawy doktorskiej. Warto odnotować tutaj możliwość uaktualnienia opracowania o nowszą wersję tabeli 1 (datowaną na 2016 r.), zawierającą klasyfikację WHO, na tę z 2022 r. Drobne dalsze uwagi to odnotowane pojedyncze błędy edytorskie we wstępie i dalszych częściach manuskryptu, np. w podrozdziale 12.1 „roku. (tabela 2) [4,7].”, brak wyjaśnienia zastosowanych skrótów np. podrozdział I.5.3.3.3 „IO”, brak odniesienia/roku zestawienia w wciąż ewoluujących schematach leczenia w tabeli 6, „neutrocyty” zamiast neutrofilii w podrozdziale 7.3 na str. 45, niewłaściwe cytowanie nr 81 *Szarkowska i wsp.* zamiast nr 83 na str 59, itp.

Należy zauważyć w dalszej części, że recenzowana rozprawa doktorska wskazuje na umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej przez Doktoranta. Autor zaznaczył w uzasadnieniu celów pracy szczególne właściwości raka jasnokomórkowego tj. zależność odpowiedzi na leczenie od stanu immunologicznego pacjenta. Jest to wyraz dążenia obecnego w nowoczesnej terapii systemowej wspomnianego już spersonalizowania leczenia, m.in. w oparciu o nowe biomarkery. Doktorant zwrócił też uwagę na istotny aspekt, jakim w tym konkretnym nowotworze jest tzw. mikrośrodowisko guza oraz naciekające je komórki układu odpornościowego, których charakterystyka może wzbogacić modele służące określeniu wskazań do leczenia uzupełniającego. Plan pracy został zaaprobowany przez Komisję

Bioetyczną przy Narodowym Instytucie Onkologii, która stwierdziła jego zgodność z zasadami naukowo-etycznymi.

Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska ma typowy układ i jest zawarta na 85 stronach. Obejmuje 28, w większości oryginalnych, rysunków i 11 tabel, zawiera ponadto 100 cytowań. Podstawowym celem pracy była ocena znaczenia rokowniczego wybranych wykładników stanu immunologicznego gospodarza na przebieg ccRCC, zwłaszcza w odniesieniu do przynależności do odpowiedniej grupy rokowniczej i przeżycia całkowitego. Wśród analizowanych parametrów znalazły się:

- a) ekspresja PD-L1 w komórkach ccRCC,
- b) naciek limfocytów TCD4+ i CD8+ w mikrośrodowisku guza,
- c) wpływ mutacji *PBRM1* na naciek limfocytów T w ccRCC, oraz
- d) zmiany w zakresie wykładników krwi obwodowej (płytki krwi, NLR).

Autor założył, że uzyskane wyniki pozwolą na uaktualnienie istniejących algorytmów postępowania dzięki schematom rokowniczym z udziałem informacji na temat zmian zachodzących w układzie immunologicznym gospodarza w przebiegu ccRCC. Wpisuje się to w najnowsze, będące w fazie badań klinicznych, prace nad wdrożeniem leczenia neo- lub adjuwantowego u chorych ze zlokalizowanym rakiem nerki. Te cele pracy świadczą pozytywnie o dojrzałości badawczej Autora, a także o tym, że umie on w krytyczny sposób weryfikować dostępne dane naukowe.

Warto tu postawić pytanie, dlaczego Autor użył właśnie parametru NLR i samej ilości płytek krwi w krwi obwodowej spośród licznie dostępnych w literaturze o udokumentowanym w ccRCC znaczeniu np. PLR, LMR czy HER, opartych o inne subpopulacje komórkowe.

Autor starannie przedstawił podstawowe elementy warsztatu badawczego, w tym zastosowane przeciwciała. Wszystkie zastosowane przeciwciała pochodziły od jednego producenta. Jeśli chodzi o PD-L1, zastosował klon E1L3N. W wielu poprzednich badaniach na świecie stosowano przeciwciała do immunohistochemii, które nie są już dostępne (np. 5H1), podczas gdy aktualnie to przeciwciała 22c3, SP142 i E1L3N są powszechnie dostępne do testów. Czy Autor spotkał się z różnymi wynikami ekspresji PD-L1 w zależności od zastosowanego przeciwciała?

W pracach dostępnych w literaturze stosowano różne punkty odcięcia pozytywnego wyniku testu ekspresji PD-L1, zwykle $\geq 5\%$ lub $> 1\%$. W niniejszej pracy nie odnalazłem informacji, jaki poziom odcięcia uznawano za pozytywne barwienie? Nie zostało także określone, w jaki sposób eliminowano błędy związane z oceną jakościową w barwieniach immunohistochemicznych, czy też czy analizę prowadził jeden patolog-współbadacz (tzw. *inter- i intraobserver variability*)?

Chciałbym dalej zauważyć, że niniejsza rozprawa doktorska stanowi oryginalne rozwiązanie przedstawionego problemu naukowego, o wysokim potencjalnym znaczeniu klinicznym. Autor wprowadził do retrospektywnej analizy 3 grupy badawcze (Rozdział III.6) na podstawie cech zaawansowania miejscowego TNM, tj. chorobę pierwotnie ograniczoną do narządu z 5-letnią obserwacją bez przerzutów, chorobą pierwotnie ograniczoną do narządu z 5-letnią obserwacją z przerzutami oraz chorobą pierwotnie uogólnioną (przerzutową). Opisana w rozdziale III

metodyka wskazuje na gruntowną orientację Autora w badaniach podstawowych, zarówno w zakresie immunohistochemii, jak i analiz bioinformatycznych. Ponadto, Autor właściwie wdrożył oraz przeprowadził wnioskowanie oparte o złożoną analizę statystyczną. Warto niemniej zauważyć, że w analizie wszystkich grup ryzyka (str. 46) użyto zwalidowanego do choroby ograniczonej do narządu model UISS. Autor częściowo uzasadnia to w podrozdziale I.2 Modele prognostyczne na str. 20-21 oraz III.7.5 na str. 46, ale, w ocenie recenzenta, użyte sformułowania nie do końca są jasne dla czytelnika.

W dalszej części recenzji dotyczącej wyników, należy stwierdzić, że uzyskane przez Autora rezultaty w pełni korespondują z założonymi celami. Doktorant rozpoczął prezentację wyników od analizy ekspresji markerów PD-L1, CTLA-4 oraz populacji limfocytów CD4 i CD8 w danych wielkoskalowych m.in. platformy UALCAN oraz TCGA w zdrowej tkance i tkance guza. Odnotował m.in. znaczne nacieki limfocytarne w mikrośrodowisku guza oraz nadekspresję CTLA-4 oraz PDL-1. Nacieki limfocytów CD8+ wiązały się z gorszym rokowaniem. Tu autor używa w zdaniu niefortunnie: „nadekspresję CD274 kodującego PD-L1 i CTLA4”, nie oddzielając ich przecinkiem, co niesłusznie sugeruje że CD274 koduje także CTLA4 (CD152) (str. 48). Na Rys. 8-10 przedstawiono prawdopodobieństwo przeżycia pacjentów z ccRCC. Warto uzupełnić podpisy rycin o określenie rodzaju analizowanego parametru (CSS? OS?). Autor skomentował rys. 8, iż wysoki poziom ekspresji CD8A korelował z gorszym przeżyciem chorych, uzyskując niemniej wynik $p=0.092$.

W dalszej, najważniejszej części wyników tj. podrozdziałach IV.2-9 Doktorant przedstawił swoje wyniki w badanych grupach. Zaobserwował następujące różnice w charakterystyce podstawowej między analizowanymi grupami: klasyfikację TNM, wielkość guza, skalę złośliwości Fuhrman, wyniki NLR oraz odsetek tzw. tumor infiltrating lymphocytes, tu konkretnie limfocytów CD8+, oraz ekspresji białka PD-L1 w jądrze komórkowym komórek ccRCC.

Elementy charakterystyki podstawowej badanych grup zostały zawarte w tabeli 8. Autor nie wskazał jednak, jak długo byli obserwowani chorzy (minimum, maksimum, mediana? follow-up). Ponadto, nie odnalazłem informacji w jakim procencie u chorych wystąpił nawrót (grupa 1 oraz 2), jak kształtowało się w różnych grupach OS, CSS czy RFS. W opisie tabeli 8 zabrakło wyjaśnienia zastosowanego sformułowania 'gr1-3', w domyśle dotyczącego opisanych powyżej grup badawczych. Sama tabela 8 zawiera zestawienie bogatej analizy danych, co niestety cierpi na czytelności/rozdzielczości rysunku, sama czcionka zaś, w ocenie recenzenta, jest już niestety za mała.

Co szczególnie istotne, w podrozdziale IV.3 w materiale klinicznym zaobserwowano nacieki zarówno limfocytów CD4 jak i CD8, ale w mikrośrodowisku ccRCC odnotowano większy odsetek CD4 niezależnie od badanej grupy pacjentów (str 52). Co ciekawe większa agresywność nowotworu przejawiała się także zwiększonym odsetkiem TILs CD8+, a zwłaszcza dotyczyło to przypadków przerzutowych.

W dalszej części swojej pracy, Autor przeanalizował ekspresję genów związanych z naciekiem limfocytów T u chorych z ccRCC w zależności od mutacji w genie *PBRM1* na podstawie danych z bazy Gene Omnibus Database o nr GSE38695. Wykazał m.in., że w mikrośrodowisku guza z

mutacją *PBRM1* występowało znacząco mniej limfocytów CD8+. Ponadto, Autor zaobserwował wzrost ekspresji PDL-1 w próbkach ccRCC w porównaniu do zdrowej tkanki, niezależnie od mutacji *PBRM1*. Z kolei ekspresja CTLA-4 była istotnie wyższa w próbkach bez mutacji *PBRM1*, a porównywalna do zdrowej tkanki w przypadku mutacji ccRCC w *PBRM1*.

Następnie autor analizował ekspresję *RRM2* w zależności od nacieku limfocytarnego i odnotował, że w miejscach w nowotworze, gdzie obserwowana była aktywność *RRM2*, mikrośrodowisko obfitowało w TILs, ale tylko CD4+. Co warto w tym miejscu podkreślić, część omawianych wyników została już opublikowana w pracy autorstwa Szarkowska i wsp. pt.: *RRM2 gene expression depends on BAF180 subunit of SWISNF chromatin remodeling complex and correlates with abundance of tumor infiltrating lymphocytes in ccRCC* (Szarkowska J, Cwiek P, Szymanski M, Rusetska N, Jancewicz I, Stachowiak M, Swiatek M, Luba M, Konopinski R, Kubala S, Zub R, Kucharz J, Wiechno P, Siedlecki JA, Markowicz S, Sarnowska E, Sarnowski TJ. *Am J Cancer Res.* 2021 Dec 15;11(12):5965-5978).

W dalszej części dysertacji, Autor analizował zależność nacieku limfocytów T na ilość i lokalizację przerzutów u chorych z rozpoznanym cc RCC i nie stwierdził występowania takiej korelacji (Rys. 21-3).

Wreszcie, w podrozdziale IV.7 autor badał ilość białka PDL-1 w tkankach pobranych od pacjentów z ccRCC. Stwierdził m.in. że w większości nie zaobserwowano jego nadekspresji w komórkach nowotworowych. Co istotne, u chorych w grupie 3, czyli z pierwotnie rozsianą chorobą, zaobserwowano jądrową lokalizację PD-L1 w komórkach ccRCC, ale ilość białka nie zależała od ilości samych przerzutów.

W podrozdziale IV.8 autor skupił się na czynnikach ryzyka wpływających na przeżycie chorych. Niezależnie od zastosowanego modelu, na przeżycie chorych miały wpływ: ilość CD4+ i CD8+, złośliwość w skali Fuhrman, PLT, NLR (tu literówka ' stosunek liczby neutrofilów do limfocytów T', str. 63), wiek w czasie operacji oraz jądrowa lokalizacja PDL-1. W przypadku zastosowania modelu Coxa w poszczególnych grupach, tylko jądrowa lokalizacja PDL-1 u chorych z grupy 1, może mieć wpływ na przeżycie. W przypadku grupy 3, znaczenie rokownicze miała ilość TILs CD8+.

Na koniec Autor w podrozdziale IV.9 autor analizował czynniki ryzyka wpływające na stopień zaawansowania choroby i wykazał, że liczba TILs CD8+ oraz jądrowa lokalizacja PD-L1 oraz wzrost PLT były czynnikami istotnymi statystycznie (jeśli analizowano grupy 2 vs. 1 oraz grupy 3 vs. 1).

W dobrze napisanej, rzeczowej dyskusji Autor dokonał krytycznego przeglądu aktualnego stanu wiedzy odnośnie zarówno oceny immunohistochemicznej, jak i dokonał oceny modeli prognostycznych ccRCC. Odniósł też wyniki uzyskane w swojej pracy do wyników podawanych w aktualnym piśmiennictwie światowym. Autor użył momentami odważnego języka, chcąc w sposób ciekawy przedstawić nurtujące badaczy raka nerki zagadnienia (np. „paradygmat wyższości chirurgii raka nerki”). Ponadto, przybliżył nowe spojrzenie na złożone zagadnienia mikrośrodowiska raka nerki, co w erze nowoczesnej immunoterapii zyskuje zupełnie nowego wydźwięku. Uzasadnił też rolę TILs oraz osi PD-1/PDL-1 w odpowiedzi immunologicznej przeciw komórkom RCC Rozważania wzbogacił o ryciny, dopełniające omawiane wyniki (Rys.

27-28). Przywołał również ostatnie, najnowsze próby klinicznie, dotyczące leczenia adjuwantowego w chorobie ograniczonej do narządu.

Dyskusję Autor podsumował zestawieniem 6 wniosków, które odpowiadają na cele pracy. Podkreśla w nich przyszłą, możliwą rolę zaproponowanej przez siebie szczegółowej oceny odpowiedzi układu immunologicznego gospodarza na RCC, opartą na badaniach immunohistochemicznych, czynnikach kliniczno-patologicznych oraz wybranych mutacjach genowych. Manuskrypt kończy zestawienie piśmiennictwa, które autor doskonale zna i cytuje właściwie. Niestety, nie znaleźli się wśród nich autorzy rodzimi.

Zaprezentowany model prognostyczny, po walidacji zewnętrznej, do której zachęcam Autora, ma szansę stać się nowym wyznacznikiem oceny rokowania u pacjentów z ccRCC w różnych stadiach zaawansowania. Z kolei wybrane biomarkery immunohistochemiczne powinny, moim zdaniem, już teraz być uzupełnieniem standardowych badań histopatologicznych pacjentów z RCC.

Reasumując, przedstawiona rozprawa doktorska lek. Macieja Łuby odpowiada wymaganiom stawianym rozprawom na stopień doktora nauk medycznych i spełnia warunki określone w art. 13 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. zm) w związku z art. 179 ust. 1 ustawy z dnia 3 lipca 2018r. Przepisy wprowadzające ustawę- Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018r. poz. 1669 z późn. zm). Stanowi w pełni dojrzałe naukowe opracowanie, które w istotny sposób może przyczynić się do lepszej stratyfikacji, a co za tym idzie lepszego leczenia pacjentów z ccRCC. Wyniki rozprawy doktorskiej z pewnością zasługują na opublikowanie w jednym z międzynarodowych czasopism o wysokim współczynniku oddziaływania. Uwagi, które poczyniłem w niniejszej recenzji w żadnym razie nie umniejszają wartości rozprawy doktorskiej lek. Macieja Łuby. Stanowią one raczej wskazówkę dla Doktoranta, co do sposobu konstruowania przyszłych eksperymentów badawczych oraz prezentacji własnych wyników.

Ze względu na bardzo dobry warsztat badawczy Doktoranta, oraz nowatorskie i wielodyscyplinarne podejście do zagadnień diagnostyki RCC, a także fakt że praca niniejsza wykracza zdecydowanie poza ramy stawiane rozprawom doktorskim, uważam że zasługuje ona na wyróżnienie. Wobec tego wnoszę do Wysokiej Rady Narodowego Instytutu Onkologii w Warszawie o dopuszczenie lek. Macieja Łuby do dalszych etapów przewodu doktorskiego i jednocześnie wnioskuję o wyróżnienie pracy *cum laude*.

Dr hab. n. med. i n. o zdr. Łukasz Zapala