INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ
IM. LUDWIKA HIRSZFELDA
POLSKIEJ AKADEMII NAUK
Centrum Doskonałości : IMMUNE
Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław, POLSKA
Telefon: (+48-71) 337 11 72, (+48-71) 370 99 30 Fax: (+48-71) 337 21 71
www.hirszfeld.pl

Wrocław, 2022-11-29

Prof. dr hab. Joanna Wietrzyk
Zakład Onkologii Doświadczalnej
Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN
Wrocław

Recenzja rozprawy doktorskiej
pt. *„Charakterystyka fenotypowa i funkcjonalna mieloidalnych komórek supresorowych w chorobie nowotworowej na przykładzie raka jelita grubego i raka prostaty – implikacje dla immunoterapii nowotworów"*
wykonanej przez mg Izabelę Siemińską
pod opieką promotora dr hab. n. med. Jarosława Barana, prof. UJ

Komórki supresorowe pochodzenia mieloidalnego (MDSC) reprezentują heterogenną, immunosupresyjną populację leukocytów, która rozwija się układowo i nacieka nowotwory. MDSC mogą hamować odpowiedź immunologiczną poprzez różne mechanizmy, w tym zużycie niezbędnych metabolitów, wytwarzanie reaktywnych form tlenu i azotu, a także wpływ na ukierunkowanie i żywotność komórek T. Ponadto MDSC odgrywają rolę w progresji guza, działając bezpośrednio na komórki nowotworowe i promując ich charakter macierzysty, angiogenezę, odkładanie elementów macierzy pozakomórkowej, przejście nabłonkowo-mezenchymalne i tworzenie przerzutów. Wiele leków stosowanych w przedklinicznych modelach nowotworów i u pacjentów wpływa na ekspansję i funkcjonowanie MDSC, często odwracając dysfunkcje immunologiczne gospodarza i umożliwiając bardziej skuteczną immunoterapię nowotworu. Rola tych komórek w progresji guzów jest więc ogromna, jednakże wciąż istniejące luki w wiedzy dotyczącej MDSC i ich roli w progresji chorób nowotworowych wymagają uzupełnienia, dlatego tematyka podjętych przez Doktorantkę badań jest niezwykle istotna.

Na rozprawę doktorską składają się 4 publikacje opublikowane w recenzowanych czasopismach naukowych o IF od 0,92 do 6,24. We wszystkich tych pracach mgr Izabela Siemińska jest pierwszą autorką. Ponieważ są to prace wieloautorskie, dołączono oświadczenia doktorantki oraz pozostałych autorów. Oświadczenia te, w mojej opinii jasno wskazują na wiodącą rolę doktorantki w powstawaniu prac przeglądowych, a także w prowadzeniu badań i opracowywaniu manuskryptów publikacji oryginalnych.

Autorka przygotowała krótkie opracowanie wprowadzające czytelnika do poruszanych w w/w publikacjach zagadnień. Krótki wstęp skonstruowała w ten sposób, aby podkreślić to, co jest niezbędne, aby zarówno w rakach okrężnicy, jak i stercza uzupełnić wiedzę na temat biologii MDSC, a więc to, co motywowało podjęcie jej badań. W tym miejscu wspomnieć należy, iż obie prace przeglądowe (opublikowane w *Frontiers in Immunology* 2020 oraz *Frontiers in Oncology* 2022) włączone do cyklu są bogatym zbiorem danych na temat MDSC w raku jelita grubego oraz prostaty. Obie te prace zawierają m.in. solidnie przygotowane tabele podsumowujące dane na

temat np. badań klinicznych dotyczących MDSC w raku prostaty, czy znanych markerów MDSC oraz ich znaczenia w raku jelita grubego. Obie prace przeglądowe, ale także rozdział „wprowadzenie" zawierają również świetnie wykonane ryciny. Tak więc, zarówno przygotowany przez Autorkę przegląd literatury, jak i obie prace przeglądowe są bardzo dobrymi opracowaniami gromadzącymi i analizującymi aktualne dane na temat znaczenia MDSC w tych dwóch chorobach nowotworowych. Dodatkowo, praca przeglądowa z 2020 roku z *Frontiers in Immunology* spotkała się z dobrym przyjęciem środowiska naukowego, gdyż cytowana jest 23 razy.

Zgromadzone i usystematyzowane dane na temat roli MDSC w raku jelita grubego i prostaty, pozwoliły Autorce wyodrębnić trzy podstawowe cele badań, tj. charakterystyka różnych populacji MDSC w krwi obwodowej, częstość ich występowania oraz znaczenie prognostyczne u chorych na raka jelita grubego i prostaty. Swoje cele szczegółowe sformułowała, głównie w oparciu o przegląd literatury, pokazujący, w przypadku raka jelita grubego, potrzebę pełniejszej charakterystyki MDCS, zwłaszcza w kontekście wpływu zabiegu chirurgicznego na poziom MDSC we krwi obwodowej pacjentów. Zaś w przypadku raka stercza – opisanie wpływu zastosowanego leczenia na populacje MDSC. Podsumowując, Autorka dobrze scharakteryzowała motywację do podjęcia badań i nakreśliła interesujące cele badawcze, które odniosła do poszczególnych publikacji, będących podstawą rozprawy.

W swoim opracowaniu, Autorka streściła także metodykę badań, choć oczywiście bardziej szczegółowo jest ona opisana w poszczególnych publikacjach. Jednakże, uważam, że rozdział ten jest pomocny w całościowym oglądzie przebiegu badań prowadzonych przed Doktorantkę i pokazuje spójne podejście do realizacji badań w tych 2 typach nowotworów. Bardzo w tym pomocna jest także rycina – schemat – przedstawiający przebieg badań.

Odnośnie metodyki prowadzonych badań mam pytanie dotyczące wieku i płci osób z grupy kontrolnej w raku jelita grubego. Ponieważ w przypadku raka prostaty, byli to mężczyźni o dopasowanym wieku, to czy w przypadku raka jelita grubego zachowano w grupie kontrolnej podobną jak w badanej proporcję kobiet i mężczyzn oraz dopasowano ich wiek? A może w opinii Autorki w tym przypadku nie ma to znaczenia?

W dalszej części opracowania Autorka opisała wyniki uzyskane po przeprowadzeniu badań nad MDSC pozyskanymi z krwi obwodowej chorych na raka jelita grubego i prostaty.

W badaniach dotyczących raka prostaty (opublikowane w *Polish Journal of Pathology,* 2020) Autorka uzyskała ciekawe dane, pokazujące, że poziom PSA może korelować z Mo-MDSC. Natomiast nie jest zależny od stadium zaawansowania choroby (wyższy niż u osób zdrowych, ale podobnie wysoki we wszystkich grupach chorych). Natomiast ciekawą obserwacją jest to, że wysoki poziom Gr-MDSC obserwowany jest tylko u pacjentów przed leczeniem, zaś wszelkie rodzaje terapii obniżają liczbę tych komórek do wartości obserwowanych u mężczyzn zdrowych. Natomiast inaczej zachowywały się Mo-MDSC – ich poziom był najniższy u osób poddanych terapii skojarzonej.

Do tej części badań nasunęły mi się następujące pytania: (1) Czy czas po jakim pobierano krew od pacjentów po leczeniu był w jakiś sposób wystandaryzowany? Czy są badania pokazujące, w jaki sposób w różnym czasie po zastosowanym leczeniu następują zmiany w populacjach MDSC? (2) Wydaje się, że analizę występowania różnych populacji MDSC pod kątem zależności od stadium zaawansowania choroby wykonano u chorych, którzy nie byli leczeni (21 pacjentów)? Ponieważ nie

INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ
IM. LUDWIKA HIRSZFELDA
POLSKIEJ AKADEMII NAUK
Centrum Doskonałości : IMMUNE
Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław, POLSKA
Telefon: (+48-71) 337 11 72, (+48-71) 370 99 30 Fax: (+48-71) 337 21 71
www.hirszfeld.pl

jest to jasno określone ani w publikacji, ani w opracowaniu, proszę o potwierdzenie, zwłaszcza, iż Autorka w dyskusji tego zagadnienia stwierdza, że *„Należy jednak wziąć pod uwagę, iż w badaniu tym uczestniczyli pacjenci zarówno przed jak i po leczeniu, a leczenie może mieć tu znaczący wpływ."* Byłoby to w sprzeczności z tym, że analizie tej poddano tylko nieleczonych pacjentów – 21 osób przedstawionych na wykresach 4 i 5 (liczba wszystkich pacjentów to 43 osoby). (3) Dodatkowo chciałam zapytać, jaką liczbę w grupie pacjentów poddanych leczeniu stanowili ci poddani radioterapii? Ciekawi mnie, czy poddając osobnej analizie tą grupę pacjentów uzyskałaby Pani dane podobne do tych z piśmiennictwa?

W badaniach dotyczących raka okrężnicy (badania opublikowane w *Translational Oncology* 2022), Autorka zastosowała szerszy wachlarz technik laboratoryjnych (oprócz cytometrii przepływowej stosowanej w obu badaniach), a więc m.in. sortowała komórki, które następnie oceniała mikroskopowo, techniką qPCR oraz wykonała test hamowania proliferacji limfocytów T. Stosowanie tych wszystkich technik na komórkach izolowanych z krwi, czy tym bardziej z guzów wymaga dużych umiejętności, a także odpowiedzialnego podejścia do materiału badanego, jakim są „podarowane" przez pacjentów komórki. Mgr Izabela Siemińska realizując swoje badania udowodniła, że w dysponuje tymi umiejętnościami. W tych badaniach wykazała, że w raku jelita grubego zwiększa się populacja wszystkich komórek MDSC, również tych „early stage" czego nie obserwowała w raku prostaty. Dodatkowo, wśród Gr-MDSC zidentyfikowała nie tylko komórki przypominające neutrofile, ale także eozynofile, co jest nowym odkryciem. Podobnie do obserwacji dotyczących chorych na raka prostaty, chorzy na raka jelita grubego mieli poziom Mo-MDSC znacząco wyższy w przypadku bardziej zaawansowanych stadiów choroby, jednakże nie wykazano różnic między poszczególnymi stadiami. Autorka oceniła także populacje limfocytów Treg oraz Th17 i TCD8+, dowodząc, że jedynie poziom Mo-MDSC dodatnio korelował z Treg oraz ujemnie z TCD8+ swoistymi dla HER-2/neu. Dalsze badania miały na celu ocenę aktywności MDSC poprzez ocenę ich wpływu na proliferację autologicznych limfocytów T indukowaną mitogenem i wykazały aktywność supresyjną wszystkich 3 subpopulacji MDSC. Autorka potwierdziła także wysoką ekspresję *iNOS* oraz produkcję NO przez Mo-MDSC w porównaniu do monocytów oraz pokazała, że tylko Mo-MDSC izolowane z guzów (ale nie z krwi obwodowej) wykazują ekspresję PD-L1. Ciekawą obserwację Autorka poczyniła analizując 5-cio letni los 11 pacjentów, u których zbadano poziom MDSC przed i po zabiegu chirurgicznym, mianowicie pacjentów z wysokim poziomem Mo-MDSC po zabiegu cechował częstszy nawrót choroby. Ciekawi mnie opinia Autorki na temat mechanizmów, które odpowiadać mogą za to zjawisko. Ponadto, w swoim opracowaniu autorka pisze: *„Ostatnim etapem była 5-cioletnia obserwacja poziomu MDSC u 11 pacjentów z CRC (...)"* Czy rzeczywiście w ciągu tych pięciu lat analizowano poziom MDSC u tych pacjentów? Jakie były wyniki tych analiz? Ponadto, jeśli wnioski dotyczące analizy cytometrycznej PD-L1 oraz produkcji NO czy ekspresji iNOS wyciągnięto na podstawie analizy MDSC pochodzących tylko od 4 pacjentów, wydają się one być zbyt dalekosiężne. Na jakiej podstawie wybrano akurat tych 4 pacjentów to wspomnianych analiz? Dlaczego w publikacji oryginalnej opisującej te zagadnienia (*Transl Oncol* 2022) na rycinie 4 C i D pokazano jedynie pojedyncze histogramy (reprezentatywne), nie pokazano zaś żadnych danych liczbowych opisujących obserwowane zjawiska?

Doceniam, że Autorka przygotowała także rozdział *„Dyskusja i podsumowanie"*, bo dało jej to okazję to całościowego ujęcia poruszanych zagadnień i skonfrontowania wyników uzyskanych w

INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ
IM. LUDWIKA HIRSZFELDA
POLSKIEJ AKADEMII NAUK
Centrum Doskonałości : IMMUNE
Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław, POLSKA
Telefon: (+48-71) 337 11 72, (+48-71) 370 99 30 Fax: (+48-71) 337 21 71
www.hirszfeld.pl

ramach obu prac oryginalnych. W rozdziale tym Autorka podkreśla nowatorskie aspekty swoich badań, a więc dane uzyskane na temat populacji e-MDSC w obu typach guzów, czy też dane dotyczące eozynofilii, znajdowanych wśród granulocytarnej frakcji MDSC. Nowymi danymi są także te pokazujące korelacje poziomu Treg z Mo-MDSC w raku jelita grubego, czy zależności dotyczące wpływu różnych form terapii na MDSC w raku prostaty. Autorka zaprezentowała również 9 wniosków podsumowujących osiągnięcia rozprawy doktorskiej.

Podsumowując, ponieważ na rozprawę doktorską składają się 4 publikacje opublikowane w latach 2020-2022 w recenzowanych czasopismach naukowych, podkreślić należy, iż badania te zostały już pozytywnie zweryfikowane przez niezależnych recenzentów, są one także cytowane, najczęściej praca przeglądowa z 2020 roku. W mojej opinii, rozprawa doktorska mgr Izabeli Siemińskiej przedstawia zbiór nowych danych, które stanowią także dobrą bazę do prowadzenia dalszych badań, w tym dotyczących mechanizmów obserwowanych zjawisk. Uzyskane wyniki mają także znaczenie kliniczne, zarówno w przypadku danych uzyskanych w raku jelita grubego, jak i prostaty, sugerując znaczenie prognostyczne MDSC, a także możliwość wykorzystania wiedzy na ich temat w celu poprawienia skuteczności terapii przeciwnowotworowych. Doktorantka wykazała się znajomością szeregu techniki biologii komórki, biologii molekularnej, zastosowała także różnorakie metody statystyczne w swoich analizach. Ponadto, to w jaki sposób przygotowała opracowanie prezentujące jej badania ujęte w 4 publikacjach pokazuje, iż ma ona szeroką wiedzę na temat badanego zagadnienia, którą potrafi w sposób syntetyczny i jasny przekazać. To ostatnie podkreślają także dobrze opracowane publikacje przeglądowe. Istotnym jest również, iż mgr Izabela Siemińska potrafi identyfikować ograniczenia swoich badań (np. mała liczba pacjentów) i krytycznie się do nich odnosi, co świadczy o jej dojrzałości naukowej.

W związku z powyższym uważam, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska Pani mgr Izabeli Siemińskiej pt. *„Charakterystyka fenotypowa i funkcjonalna mieloidalnych komórek supresorowych w chorobie nowotworowej na przykładzie raka jelita grubego i raka prostaty – implikacje dla immunoterapii nowotworów"* spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim określone w Ustawie – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2020 r. poz. 85 z późn. zm.), a dorobek naukowy kandydatki uzasadnia nadanie stopnia naukowego doktora nauk medycznych. Tym samym zwracam się do Rady Dyscypliny Nauki medyczne Uniwersytetu Jagiellońskiego o dopuszczenie mgr Izabeli Siemińskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Prof. dr hab. Joanna Wietrzyk
Kierownik Laboratorium
Doświadczalnej Terapii Przeciwnowotworowej