

Wzrost 27.08.2015  
M. Poelmans-Ochocka



INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ

im. Ludwika Hirsztfeldta

POLSKIEJ AKADEMII NAUK

Centrum Doskonałości: IMMUNE

ul. Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław

tel. (+48-71) 337 11 72, (+48-71) 370 99 30 fax: (+48-71) 337 21 71

<http://www.iitd.pan.wroc.pl>

Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu  
DZIEKANAT WYDZIAŁU LEKARSKIEGO

17 SIE. 2015

Ldz. DL/ 2894/15  
Znak sprawy DL-

Dr hab. n. med. Agata Kosmaczewska, prof. PAN  
Zakład Terapii Doświadczalnej  
Laboratorium Immunopatologii

Wrocław, 12.08.2015 r.

## RECENZJA

### rozprawy doktorskiej mgr inż. Ewy Wyrodek

#### pt. „Ocena ekspresji ludzkiego leukocytarnego antygeny G (HLA-G) i jego receptorów: ILT-2 i KIR2DL4 w nowotworowej i nienowotworowej tkance płuca”

**Promotor: dr hab. n. med. Barbara Ślesak, prof. nadzw.**

Rak płuca jest ogólnym pojęciem grupy nowotworów złośliwych płuca, heterogennych pod względem histologicznym i klinicznym. Jest najczęściej rozpoznawanym nowotworem złośliwym na świecie; Polska należy do krajów o najwyższych współczynnikach zapadalności i umieralności na raka płuca zarówno wśród mężczyzn, jak i kobiet. Rak płuca charakteryzuje się dużą dynamiką wzrostu oraz skłonnością do wczesnego rozsiewu. Pomimo dużego postępu, jaki dokonał się w ostatnich kilkudziesięciu latach zarówno w poznaniu patogenez, jak i leczeniu, rokowanie w raku płuca pozostaje nadal niekorzystne. Jedną z najważniejszych przyczyn szybkiego postępu choroby i złej prognozy są znaczne zaburzenia immunologiczne, sprzyjające „ucieczce” komórek nowotworowych spod nadzoru immunologicznego. Wiele z tych zaburzeń dotyczy elementów głównego układu zgodności tkankowej (MHC), zwanego też układem ludzkich antygenów leukocytarnych (HLA).

Zaburzenia immunologiczne uczestniczące w rozwoju i progresji nowotworu od wielu lat są przedmiotem intensywnych badań. Przedstawiona do recenzji praca doktorska, poświęcona jednemu z elementów układu HLA, jest kontynuacją tych poszukiwań. Doktorantka w swojej pracy zajęła się cząsteczką HLA-G, należąca do nieklasycznych antygenów HLA klasy I, której przypisuje się rolę w rozwoju tolerancji immunologicznej. Swoją immunosupresorową rolę antygen HLA-G realizuje dzięki interakcji z receptorami znajdującymi się na komórkach efektorowych układu odpornościowego uczestniczących m.in. w odpowiedzi przeciwnowotworowej. Temat rozprawy doktorskiej podjęty przez Doktorantkę jest więc aktualny i ma duże znaczenie poznawcze i kliniczne.

Rozprawa została zredagowana w formie liczącego 127 stron maszynopisu o układzie typowym dla tego rodzaju opracowań. Proporcje pomiędzy poszczególnymi częściami dysertacji są poprawne. Praca ma staranną szatę graficzną, napisana jest w sposób jasny i rzeczowy. W tekście zamieszczono 21 tabel i 53 ryciny, które w istotny sposób ułatwiają interpretację założeń i uzyskanych wyników badań, a także 142 pozycje literaturowe, w większości opublikowane w latach 2007-2015 i prawidłowo zacytowane w pracy. Pojedyncze starsze prace (nawet z lat 80-tych) można

usprawiedliwić ich przełomowym znaczeniem. Na zakończenie autorka przedstawia 5 prawidłowo sformułowanych wniosków, dobrze udokumentowanych wynikami przeprowadzonych badań. Praca zawiera też poprawnie napisane streszczenie w języku polskim i angielskim.

Wstęp stanowiący uzasadnienie podjęcia badań własnych, jest napisany interesująco i rzeczowo. Doktorantka przedstawia w nim dane epidemiologiczne, etiopatologię wraz z zobowiązującą klasyfikacją histopatologiczną raka płuca. Opisuje też ogólnie główny układ zgodności tkankowej MHC, którego elementem jest antygen HLA-G, będący przedmiotem badań własnych Doktorantki. Większą część wprowadzenia Autorka poświęca charakterystyce cząsteczki HLA-G, ze szczegółowym omówieniem jej struktury, ekspresji, a także roli w układzie odpornościowym, omawiając przy tej okazji komórkowe receptory, na które oddziałuje antygen HLA-G. Na uwagę zasługuje dobre rozumienie przez Doktorantkę patomechanizmu immunosupresyjnego działania HLA-G; zasadniczym skutkiem interakcji HLA-G/receptor jest zmniejszenie aktywności limfocytów cytotoksycznych oraz komórek NK, a także hamowanie proliferacji limfocytów T pomocniczych oraz indukowanie różnicowania limfocytów T regulatorowych. W kolejnych rozdziałach wstępu Autorka opisuje różne sytuacje kliniczne, w których antygen HLA-G odgrywa ważną rolę, podkreślając korzystne działanie antygeny HLA-G w rozwoju ciąży, w tolerancji przeszczepów oraz chorobach autoimmunizacyjnych poprzez wyciszenie reakcji immunologicznej na allo- i autoantygeny. Z kolei w infekcjach wirusowych i nowotworach cząsteczka HLA-G umożliwia unikanie mechanizmów kontroli immunologicznej, co sprzyja rozwojowi tych chorób. Ze szczególnym znanstwem tematu dokładnie omawia udział HLA-G w zjawisku immunoredagowania nowotworu, z uwzględnieniem trzech faz tego procesu: eliminacji komórek nowotworowych, równowagi, a następnie ucieczki spod nadzoru immunologicznego. Wymienia też sposoby na unikanie kontroli immunologicznej, wśród których ważną rolę przypisuje się ekspresji HLA-G na komórkach nowotworowych. Doktorantka przytacza aktualne piśmiennictwo dotyczące ekspresji i funkcji cząsteczki HLA-G i wybranych jej receptorów ILT-2 i KIR2DL4 w stanach zdrowia i choroby. Autorka zwraca również uwagę na fakt preferencyjnego występowania ekspresji HLA-G w komórkach nowotworowych, z rzadko spotykaną ekspresją w prawidłowych komórkach otaczających guz. Słusznie też podkreśla, że pomimo dużej różnorodności ekspresji HLA-G w guzach, nawet niski jej poziom może mieć duże znaczenie biologiczne wystarczające do indukcji tolerancji immunologicznej. W świetle dotychczasowych badań wydaje się, że cząsteczka HLA-G poprzez oddziaływanie na receptory ILT-2 i KIR2DL4 na efektorowych komórkach układu odpornościowego odgrywa ważną rolę w indukowaniu stanu immunosupresji sprzyjającej wzrostowi i progresji nowotworu. Jednak w dostępnej literaturze opisującej wspomniane zagadnienia brakuje doniesień o jednoczesnej analizie ekspresji antygeny HLA-G i jego receptorów ILT-2 i KIR2DL4 w nowotworowej i nienowotworowej tkance płuca. Na tym tle oceniana praca doktorska wyróżnia się całościowym ujęciem problematyki.

W rozdziale „Założenia i cel pracy” Doktorantka stawia dobrze sformułowaną hipotezę badawczą, że stosunkowo niska skuteczność terapii niedrobnokomórkowego raka płuca wskazuje na duży udział czynników zaangażowanych w skuteczną ucieczkę komórek nowotworowych spod kontroli immunologicznej. Zakłada także, że wysoki stopień immunosupresji spotykany w przebiegu raka płuca może wynikać z interakcji antygeny HLA-G zlokalizowanego na komórkach nowotworowych z jego receptorami na komórkach immunologicznie kompetentnych, włączonych w odpowiedź przeciwnowotworową. Głównym jasno sformułowanym celem badań przeprowadzonych przez Doktorantkę była ocena ekspresji białka HLA-G oraz jego komórkowych receptorów: ILT-2 i KIR2DL4 w raku płuca oraz w tkance nienowotworowej płuca (czyli zdrowym mięszu i/lub kikucie

oskrzela). Ponadto mgr inż. Wyrodek postanowiła dokonać analizy wzajemnych zależności pomiędzy ekspresją badanych czynników immunologicznych a parametrami kliniczno-histologicznymi i czynnikami epidemiologicznym, a także określić ich związek z całkowitym przeżyciem pacjentów.

Badania zostały przeprowadzone w grupie 90 chorych na niedrobnokomórkowego raka płuca (z różnym statusem dotyczącym palenia tytoniu) w różnych stadiach klinicznych przed rozpoczęciem leczenia cytostatycznego. Materiał do badań stanowiły tkanki uzyskane w trakcie zabiegów chirurgicznych lub biopsyjnych pobrane z guza pierwotnego, a w 66 przypadkach - dodatkowo z nienowotworowej tkanki płuca (mięsz i/lub kikut oskrzela), sklasyfikowanych pod względem histologicznym. Doktorantka wykonała zaplanowane doświadczenia poprawnie stosując metodę immunohistochemiczną z użyciem przeciwciał monoklonalnych anti-HLA-G i poliklonalnych: anti-ILT-2 i anti-KIR2DL4 - adekwatnych do celu pracy, z zastosowaniem czułego systemu detekcyjnego EnVision. Prawidłowo zastosowała również kontrole: negatywne oraz pozytywne dla wszystkich zastosowanych przeciwciał. W ocenie wybranych markerów immunologicznych w preparatach tkankowych uwzględniła dodatkowo ich lokalizację i intensywność reakcji immunohistochemicznej oraz odsetek reaktywnej tkanki, stosując półilościową skalę wg Remmele oraz indeks kumulacyjny IRS.

Metodyka badań jest poprawna i nowoczesna, a także, co warto podkreślić, stosunkowo tania. Jest przystępnie opisana w formie przypominającej protokół doświadczalny. Doktorantka wyniki swoich badań przedstawia przejrzysto w tabelach i na kolorowych rycinach, które stanowią fotograficzną dokumentację zmian histopatologicznych obserwowanych w badanych skrawkach tkankowych w mikroskopie świetlnym. Pomimo że zdjęcia zamieszczone w pracy są opatrzone odpowiednimi podpisami, uważam, że dla czytelnika mniej zapoznanego z oceną preparatów histologicznych bardzo przydatne byłoby zamieszczenie strzałek wskazujących na wybranych zdjęciach opisywane w tekście zmiany.

Uzyskane wyniki badań Autorka rozprawy właściwie interpretuje opierając się na statystycznych opracowaniach. Wśród nich za najcenniejsze uważam wyniki ściśle związane z tematem dysertacji, czyli ocenę parametrów immunologicznych. Doktorantka stosując relatywnie tanią i dostępną metodę immunohistochemiczną wykazała obecność supresorowego antygeny HLA-G w tkance nowotworowej u ponad połowy chorych na niedrobnokomórkowego raka płuca, istotnie częściej z wyższych stopniach zaawansowania klinicznego. Dodatkowo w wielu przypadkach wykazała obecność HLA-G w zdrowych tkankach bezpośrednio otaczających guz, co zdaniem autorki, ma sprzyjać indukowaniu lokalnej immunosupresji w mikrośrodowisku nowotworu. Doktorantka po raz pierwszy przy użyciu metody immunohistochemicznej wykazała także ekspresję wybranych receptorów komórkowych: ILT-2 i KIR2DL4, będących naturalnymi ligandami dla antygeny HLA-G, w odpowiednio 30% i 50% przypadków raka płuca, wzrastającą w wyższych stadiach zaawansowania klinicznego choroby. Dodatkowo udało się Autorce wykazać związek ekspresji KIR2DL4 z krótszym czasem przeżycia chorych. Przeprowadzona przez mgr inż. Wyrodek analiza częstości występowania poszczególnych wariantów immunofenotypowych pozwoliła stwierdzić, że wyraźnie najczęściej występująca (bo stwierdzona aż w ponad 30% przypadków niedrobnokomórkowego raka płuca) była kombinacja ko-ekspresji HLA-G z receptorem ILT-2. Wyniki te należy uznać za bardzo interesujące i wnoszące nowe informacje do wiedzy dotyczącej statusu immunologicznego pacjentów z niedrobnokomórkowym rakiem płuca. Autorka omawia je rzetelnie konfrontując swoje spostrzeżenia z wynikami uzyskanym przez innych badaczy zajmującymi się podobnymi zagadnieniami. Doktorantka słusznie wnioskuje, że częstsze występowanie supresorowego antygeny HLA-G w tkance nowotworowej płuca oraz jego

receptorów ILT-2 i KIR2DL4 na komórkach immunologicznie kompetentnych naciekających guz u chorych z zaawansowanym nowotworem może świadczyć o udziale tych czynników w indukowaniu immunosupresji sprzyjającej progresji niedrobnokomórkowego raka płuca.

Nie ma istotnych uwag dotyczących redakcji pracy. Uważam jedynie, że niektóre terminy użyte przez Doktorantkę w dysertacji nie są najbardziej zręczne. Autorka w niektórych przypadkach posługuje się terminem „immunoreaktywność antygeny” dla określenia obecności badanej cząsteczki w tkance. Uważam, że termin „ekspresja antygeny” jest pojęciem mniej technicznym i powszechnie używanym w piśmiennictwie naukowym poświęconym tej tematyce. Poza tym w pracy znalazło się kilka niedociągnięć edytorskich, które w żaden sposób nie zmniejszają merytorycznej wartości dysertacji.

**Oceniając** rozprawę doktorską mgr Ewy Wyrodek pragnę podkreślić, że nie mam żadnych zastrzeżeń merytorycznych do założeń, celu podjętych badań i zastosowanych metod badawczych. Rozprawa została napisana przejrzyście, nosi cechy samodzielnego i właściwie zaplanowanego, a także starannie wykonanego i udokumentowanego opracowania naukowego. Autorka wykazała się bardzo dobrą znajomością tematyki. Z dużą łatwością porusza się w omawianym temacie, co można zauważyć zwłaszcza czytając wstęp i dyskusję ocenianej rozprawy, w której rzeczowo omawia uzyskane wyniki w odniesieniu do danych literaturowych. Badania te mają oryginalny charakter, a uzyskane wyniki są interesujące i wnoszą istotny wkład w poznanie patomechanizmu zaburzeń immunologicznych leżących u podłoża szybkiego wzrostu i rozsiewu komórek nowotworowych w przebiegu niedrobnokomórkowego raka płuca i zasługują na opublikowanie w prestiżowym czasopiśmie naukowym. Poza aspektem poznawczym można przedstawionym przez Doktorantkę wynikom przypisać także znaczenie kliniczno-praktyczne. Z uwagi na wykazanie ko-ekspresji antygeny HLA-G i i jego receptora ILT-2 jako najczęstszego wariantu immunofenotypowego występującego w tkance nowotworowej płuca, wydaje się, że modulowanie ekspresji tych cząsteczek lub ich funkcji za pomocą np. przeciwciał blokujących mogłoby mieć istotny wpływ na poprawę funkcji efektorowych komórek układu immunologicznego uczestniczących w odpowiedzi przeciwnowotworowej. Istnieje więc nadzieja, że wiedza ta może w przyszłości pozwolić na szersze zastosowanie immunoterapii u chorych na niedrobnokomórkowego raka płuca, co znacząco może wpłynąć na poprawę wyników leczenia tego nowotworu.

**W podsumowaniu** uważam, że przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska stanowi kompleksowe i dojrzałe rozwiązanie problemu badawczego postawionego przez doktorantkę i świadczy o dojrzałości naukowej mgr inż. Ewy Wyrodek. Z powyższych względów stwierdzam, że przedstawiona do oceny praca doktorska pt. „Ocena ekspresji ludzkiego leukocytarnego antygeny G (HLA-G) i jego receptorów: ILT-2 i KIR2DL4 w nowotworowej i nienowotworowej tkance płuca” spełnia warunki określone w art. 13 ust. 1 ustawy z dn. 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytułach naukowych oraz o stopniach i tytułach w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 z późn. zm.). Mam zaszczyt przedstawić Wysokiej Radzie Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu wniosek o przyjęcie rozprawy doktorskiej mgr inż. Ewy Wyrodek i dopuszczenie jej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Z poważaniem



dr hab. n. med. Agata Kosmaczewska, prof. PAN