

dr hab. n. med. Agnieszka Bojarska-Junak, prof. ucz.

Katedra i Zakład Immunologii Klinicznej
Uniwersytet Medyczny w Lublinie
ul. Chodźki 4a, 20-093 Lublin
tel. 81 4486420

Lublin, 30.07.2023r.

Recenzja

**rozprawy doktorskiej lek. Anny Kulikowskiej de Nałęcz
z Oddziału Klinicznego Hematologii, Onkologii Hematologicznej i Chorób
Wewnętrznych Szpitala Wojewódzkiego w Opolu
z tytułu**

***„Ekspresja supresorowych antygenów BTLA, PD-1 i CTLA-4 w populacji efektorowych
i regulatorowych limfocytów krwi obwodowej u chorych na szpiczaka plazmocytozowego”***

Promotor pracy: dr hab. n. med. Agata Kosmaczewska

Przedstawiona mi do recenzji praca doktorska została wykonana pod kierunkiem naukowym Pani dr hab. n. med. Agaty Kosmaczewskiej. Podstawę formalną wykonania recenzji stanowi pismo Przewodniczącego Rady Dyscypliny Nauki Medyczne Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu prof. dr hab. Agnieszki Hałoń.

Szpiczak plazmocytozowy (*multiple myeloma*, MM) jest złośliwą chorobą nowotworową układu krwiotwórczego, charakteryzującą się klonalną proliferacją atypowych plazmocytozów w szpiku kostnym, której zazwyczaj towarzyszy wydzielanie nieprawidłowego białka monoklonalnego. Jest to choroba wykraczająca poza zaburzenia w szpiku kostnym i krwi obwodowej albowiem jej następstwa obejmują zmiany w zakresie układu kostnego, naczyń krwionośnych, nerek oraz układu nerwowego. Ponadto, właściwością szpiczaka plazmocytozowego jest postępujący rozwój zaburzeń immunologicznych. W związku z tym rośnie zainteresowanie układem odpornościowym i jego rolą w procesie rozwoju MM, a co za tym idzie, lekami celującymi w poszczególne ogniwa tego układu. Powszechnie wiadomo, że limfocyty T odgrywają istotną rolę w rozpoznawaniu i eliminowaniu komórek nowotworowych, a ich dysfunkcja, spowodowana m.in. stanem „wyczerpania” sprzyja, ucieczce nowotworowych komórek plazmatycznych spod nadzoru immunologicznego i dalszego rozwoju choroby. Limfocyty o cechach „wyczerpania” wykazują zwiększoną ekspresję immunologicznych punktów kontrolnych w tym receptora PD-1, TIGIT, BTLA czy CTLA-4. Wzrost ekspresji receptorów inhibujących przyczynia się do ograniczenia funkcji efektorowej limfocytów T, co jest ściśle związane z postępowaniem choroby i złym rokowaniem. Przeżywalność pacjentów ze szpiczakiem plazmocytozowym poprawiła się w ciągu ostatniej dekady dzięki wprowadzeniu leków immunomodulujących, inhibitorów proteasomu i przeciwciał monoklonalnych. Niestety szpiczak plazmocytozowy nadal pozostaje chorobą nieuleczalną. Sukces immunoterapii ukierunkowanej na blokowanie/wyłączenie funkcji receptorów hamujących odpowiedź immunologiczną zmienił spojrzenie na leczenie guzów litych i chłoniaków. Inhibitory CTLA-4, PD-1 (jak i PD-L1/L2) znoszą ich negatywne działanie wobec odpowiedzi przeciwnowotworowej przyczyniając się do śmierci komórek nowotworowych. Jednak, w przypadku szpiczaka plazmocytozowego zastosowanie inhibitorów punktów kontroli immunologicznej w badaniach

klinicznych przyniosło wyniki niezgodne z oczekiwaniami. Może to wynikać z odmiennego mikrośrodowiska immunologicznego oraz różnego stopnia „wyczerpania” limfocytów T. Dlatego warto dokładniej zbadać charakterystykę immunosupresji limfocytów T, a zwłaszcza związek między złożoną siecią receptorów immunosupresyjnych a „wyczerpaniem” limfocytów T u pacjentów ze szpiczakiem plazmocytowym.

W związku z powyższym, wybór tematu, cel i założenia przedłożonej do recenzji rozprawy doktorskiej są niezwykle istotne i wpisują się w ogólnościatowe trendy naukowe i kliniczne. Podjęty przez Doktorantkę problem jest problemem aktualnym i ważnym, zarówno pod względem teoretycznym, jak i praktycznym. Tytuł dysertacji odzwierciedla zakres przeprowadzonych badań.

Rozprawa doktorska lek. Anny Kulikowskiej de Nałęcz liczy 113 stron i została przygotowana zgodnie z zaleceniami dotyczącymi rozpraw doktorskich opartych na jednotematycznym cyklu publikacji naukowych. Przedstawione do oceny opracowanie obejmuje stronę tytułową, spis treści, wykaz prac naukowych wchodzących w skład cyklu wraz z ich danymi bibliometrycznymi, streszczenie w języku polskim i streszczenie w języku angielskim, wstęp, założenia i cel pracy, materiał i metody badań, publikacje stanowiące pracę doktorską, podsumowanie wyników, wnioski, wykaz stosowanych skrótów oraz piśmiennictwo liczące 35 pozycji. W postaci załączników Doktorantka umieściła oświadczenia współautorów, notę biograficzną, wykaz pozostałego dorobku naukowego Autorki oraz opinię Komisji Bioetycznej. W dysertacji Autorka zamieściła pełne teksty publikacji stanowiących rozprawę.

W mojej ocenie, układ pracy nie budzi większych zastrzeżeń. Jest przejrzysty i zgodny z wymaganiami stawianymi rozprawom doktorskim. Literatura przytoczona w pracy świadczy o rozległej wiedzy i orientacji Doktorantki w dziedzinie, którą uprawia. Ponad 80% cytowanych prac zostało opublikowane po 2013 roku. Można uznać, że Autorka zajmuje się tematyką, która jest aktualna. O kompetencji Doktorantki świadczą również publikacje stanowiące integralną część rozprawy oraz artykuły (zamieszczone w wykazie), których jest współautorem.

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska stanowi spójny tematycznie cykl trzech publikacji naukowych (jednej przeglądowej i dwóch oryginalnych), opublikowanych w latach 2013-2023:

1. Kosmaczewska A, Masternak A, Kosciow K. *The functional significance of the bone marrow microenvironment in multiple myeloma development and progression*. OA Immunology 2013;1(1)7.
2. Kulikowska de Nałęcz A, Cizak L, Usnarska-Zubkiewicz L, Frydecka I, Pawlak E, Szmyrka M, Kosmaczewska A. *Deregulated Expression of Immune Checkpoints on Circulating CD4 T Cells May Complicate Clinical Outcome and Response to Treatment with Checkpoint Inhibitors in Multiple Myeloma Patients*. Int J Mol Sci. 2021;22(17):9298.
3. Kulikowska de Nałęcz A, Cizak L, Usnarska-Zubkiewicz L, Pawlak E, Frydecka I, Szmyrka M, Kosmaczewska A. *Inappropriate Expression of PD-1 and CTLA-4 Checkpoints in Myeloma Patients Is More Pronounced at Diagnosis: Implications for Time to Progression and Response to Therapeutic Checkpoint Inhibitors*. Int J Mol Sci. 2023;24(6):5730.

Wszystkie zamieszczone w rozprawie prace są wieloautorskie, co potwierdza umiejętność pracy zespołowej Doktorantki. Praca doktorska zawiera oświadczenia współautorów o ich wkładzie merytorycznym w wykonaniu poszczególnych publikacji. Wkład doktorantki obejmował opracowanie koncepcji pracy, opracowanie metodologii badawczej, zbieranie materiału, analizę i interpretację danych klinicznych pacjentów włączonych do badania, analizę i interpretację danych pozyskanych w toku badania, gromadzenie piśmiennictwa, pisanie manuskryptów i ostatecznej wersji publikacji. Prace oryginalne ukazały się drukiem w czasopiśmie ujętym w bazie Journal Citation Reports

o łącznym współczynniku oddziaływania (IF) równym 12,416. Doktorantka jest pierwszą autorką publikacji oryginalnych. W pracy przeglądowej lek. Anna Kulikowska de Nałęcz jest drugim autorem.

Wobec powyższego kryteria niezbędne do przedstawienia rozprawy doktorskiej zostały wypełnione pod względem formalnym.

We „*WSTĘPIE*” pracy Doktorantka w zwięzły sposób przedstawiła informacje na temat zaburzeń w obrębie populacji limfocytów T w przebiegu szpiczaka plazmocytozy. Ta część rozprawy doktorskiej stanowi uzasadnienie podjętej tematyki badawczej. Tekst ten jest napisany klarownie i syntetycznie. W oparciu o przesłanki zawarte we „*WSTĘPIE*” Doktorantka sformułowała cele badań. Cele szczegółowe zamieszczone zostały oczywiście w każdej z prac wchodzących w skład rozprawy.

W rozdziale „*MATERIAŁ I METODY*” Doktorantka opisała grupę badaną i grupę kontrolną, przedstawiła metodykę badań i analizę statystyczną. Przebadano 40 chorych z rozpoznaniem szpiczaka plazmocytozy leczonych w Klinice Hematologii we Wrocławiu oraz w Oddziale Hematologii w Opolu. Chciałabym podkreślić, że zastosowane metody zostały również dokładnie opisane w poszczególnych pracach eksperymentalnych wchodzących w skład rozprawy. Dobór metod badawczych i statystycznych został już szczegółowo oceniony przez niezależnych recenzentów poszczególnych prac i nie budzą żadnych wątpliwości. Wykonanie ambitnych i pracochłonnych eksperymentów, nie budzi żadnych zastrzeżeń. Szczegółowy opis wykonanych oznaczeń dowodzi rzetelności wykonanych badań. Należy podkreślić fakt zastosowania przez Doktorantkę w pracach oryginalnych szerokiego wachlarza technik laboratoryjnych, co świadczy o bogatym warsztacie metodycznym Autorki.

Temat pracy dotyczy ważnego i aktualnego problemu klinicznego. Oryginalne prace badawcze stanowiące podstawę prezentowanej pracy doktorskiej były już poddane wcześniejszej ocenie przez redakcje czasopism i niezależnych recenzentów i również ze względu na rangę czasopism nie budzą żadnych wątpliwości. Prace stanowiące rozprawę tworzą integralną całość, są spójne tematycznie i szczegółowo opracowane.

Pierwsza praca opublikowana w OA Immunology (2013), pt. „*The functional significance of the bone marrow microenvironment in multiple myeloma development and progression*” to podsumowanie wiedzy na temat szpiczaka plazmocytozy. Głównym tematem artykułu jest rola mikrośrodowiska szpiku kostnego w patogenezie MM. Opisano w nim wzajemne interakcje między komórkami mikrośrodowiska oraz klonem nowotworowym zachodzące na zasadzie bezpośrednich oddziaływań powierzchniowych cząsteczek adhezyjnych i receptorowych, a także za pośrednictwem uwalnianych przez te komórki parakrynych mediatorów umożliwiających przeżycie, proliferację i różnicowanie atypowych plazmocytozy oraz zasiedlanie szpiku kostnego, inwazję do nowych regionów szpiku i lokalizacji pozaszpikowych. Treść zawarta w pracy przeglądowej stanowi dobre uzasadnienie kontynuacji badań nad patogenezą szpiczaka plazmocytozy.

Pracę przeglądową oceniam pozytywnie, jednak podczas jej lektury nasunęły mi się pewne wątpliwości.

- *Praca przeglądowa opublikowana w 2013 roku stanowi teoretyczne wprowadzenie do dalszej części pracy, jednakże w przedstawionym opracowaniu brakuje mi krótkiego przeglądu wiedzy na temat punktów kontroli układu immunologicznego, takich jak PD-1, CTLA-4, czy BTLA z okresu przed rozpoczęciem przez Doktorantkę badań i informacji o przesłankach do podjęcia właśnie tego tematu. Dlatego stan wiedzy proponuję omówić podczas prezentacji rozprawy doktorskiej.*

Następne, spójne tematycznie, dwie publikacje oryginalne (*Int J Mol Sci.* 2021 i *Int J Mol Sci.* 2023) to wynik badań własnej grupy 40 chorych z rozpoznaniem szpiczaka plazmocytoowego. W pierwszej, pt. „*Deregulated Expression of Immune Checkpoints on Circulating CD4 T Cells May Complicate Clinical Outcome and Response to Treatment with Checkpoint Inhibitors in Multiple Myeloma Patients*” lek. Anna Kulikowska de Nałęcz oceniła błonową ekspresję immunologicznych punktów kontroli: PD-1, CTLA-4, BTLA-4 na limfocytach CD4⁺ (zarówno efektorowych, jak i regulatorowych) u chorych z aktywnym szpiczakiem plazmocytoowym w różnych fazach choroby. Na poziomie pojedynczej komórki stwierdzono utratę ekspresji badanych punktów kontrolnych na limfocytach T CD4⁺ głównie w momencie diagnozy MM. Nowatorskim aspektem pracy było wykazanie, że jedynie receptor programowanej śmierci (PD-1) jest stwierdzany na istotnie wyższym odsetku limfocytów T CD4⁺ niezależnie od etapu klinicznego szpiczaka plazmocytoowego. Autorka wnioskuje, że receptor ten może pełnić kluczową rolę w zaburzeniach odporności komórkowej i rozwoju immunosupresji związanej z tą chorobą. Interesujące są wyniki badań wskazujące, że etapy rozwoju szpiczaka plazmocytoowego są wyraźnie związane z utratą ekspresji ocenianych receptorów hamujących, co może świadczyć o upośledzonej tolerancji immunologicznej i występowaniu komórek o wysokim potencjale autoreaktywnym w przebiegu szpiczaka plazmocytoowego, jak i w czasie terapii skierowanej przeciwko punktom kontroli immunologicznej (PD-1 i/lub CTLA-4).

W kolejnej publikacji oryginalnej pt. „*Inappropriate Expression of PD-1 and CTLA-4 Checkpoints in Myeloma Patients is More Pronounced at Diagnosis: Implications for Time to Progression and Response to Therapeutic Checkpoint Inhibitors*” autorka oceniła znaczenie poziomu ekspresji cząsteczek PD-1 i CTLA-4 na limfocytach T CD4⁺ jako potencjalnego czynnika predykcji odpowiedzi na zastosowanie inhibitorów punktów kontrolnych PD-1/PD1-L i CTLA-4. W pracy tej Autorka wykazała, że niska ekspresja CTLA-4 w momencie rozpoznania szpiczaka plazmocytoowego lub wyższe poziomy ekspresji PD-1 u pacjentów z nawrotowym MM (RRMM) wiążą się z istotnie skróconym czasem do wystąpienia progresji (TTP). Ważnym odkryciem było wykazanie, że blokowanie CTLA-4 może być niekorzystną strategią terapeutyczną dla pacjentów z nowo rozpoznanym MM. Doktoratka sugeruje, że blokowanie immunologicznych punktów kontrolnych może być korzystną formą immunoterapii tylko dla części pacjentów z nawrotowym MM. Autorka wskazuje na zasadność oznaczania ekspresji PD-1 w nawrotowym MM przed rozpoczęciem terapii nakierowanej na blokowanie tego receptora. Należy podkreślić, że podjęty przez lek. Annę Kulikowską de Nałęcz temat stwarza solidną podstawę do kolejnych badań na tym polu.

Po zapoznaniu się z treścią pracy doktorskiej oraz oświadczeniami Doktorantki i współautorów prac stanowiących integralną część rozprawy uważam, że prezentowane w rozprawie wyniki związane ze zdefiniowanymi przez Autorkę celami, stanowią samodzielny i oryginalny dorobek lek. Anny Kulikowskiej de Nałęcz. Bezpośrednio w odniesieniu do prezentowanych wyników badań trudno jest sformułować poważniejsze zastrzeżenia merytoryczne. Wszystkie wyniki przedstawione w rozprawie zostały opublikowane w pracach, w których podlegały analizie i ocenie. Dużym walorem prac oryginalnych jest szczegółowa dyskusja, świadcząca o doskonałej znajomości tematu.

Poza pełnymi tekstami prac rozprawa zawiera również omówienie cyklu prac - *PODSUMOWANIE WYNIKÓW* - przygotowane w j. polskim. Ta część pracy przygotowana jest starannie i jest pomocna w dostrzeżeniu i zapamiętaniu, głównych wniosków z wykonanych badań.

Autorka formułuje sześć *WNIOSKÓW* podsumowujących rozprawę doktorską. Wnioski odpowiadają na wyznaczone cele pracy. Ostatni, szósty wniosek jest cenną sugestią dotyczącą możliwości

praktycznego wykorzystania oceny ekspresji PD-1 w kwalifikacji chorych z nawrotowym MM do immunoterapii za pomocą inhibitorów immunologicznych punktów kontrolnych (anty-PD-1/PD-L1).

Uważam, że recenzowana rozprawa zawiera wiele oryginalnych wyników i wnosi wartościowy wkład w rozwój nauk medycznych. Nie zauważyłam w trakcie lektury rozprawy błędów merytorycznych. Jednakże, wywiązując się z obowiązku recenzenta zwracam uwagę na kilka uchybień, nie umniejszających merytorycznej wartości pracy.

- W sformułowanych wnioskach brakuje mi tego, który dotyczyłby receptora BTLA. Autorka niewiele uwagi poświęca tej cząsteczce także we *WSTĘPIE* i *PODSUMOWANIU WYNIKÓW*. Zastanawiam się, czy ocena ekspresji receptora BTLA może być użyteczna klinicznie?
- W rozprawie znaleźć można drobne błędy literowe i typograficzne, które są nie do uniknięcia w tego typu przedsięwzięciach.
- Mam również uwagę, co do długości zdań. Jest to szczególnie widoczne we *WNIOSKACH*. Długie konstrukcje zdań utrudniają zrozumienie treści. Dzięki podzieleniu zdania odbiór byłby bardziej zrozumiały, przy jednoczesnym zachowaniu sensu.
- Spójnik „i” to spójnik łączny, więc nie stawia się przed nim przecinka.

WNIOSKI KOŃCOWE

Rozprawa doktorska lek. Anny Kulikowskiej de Nałęcz pt.: *„Ekspresja supresorowych antygenów BTLA, PD-1 i CTLA-4 w populacji efektorowych i regulatorowych limfocytów krwi obwodowej u chorych na szpiczaka plazmocytowego”* stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego. Doktorantka w rozprawie wykazała się znajomością swojej tematyki badawczej oraz umiejętnością interpretacji i wyciągania wniosków z przeprowadzonych badań. W swojej pracy zaprezentowała zróżnicowany warsztat metodyczny, co podnosi wiarygodność uzyskanych wyników. Otrzymane wyniki otwierają dalsze perspektywy badawcze. Przedłożona rozprawa doktorska potwierdza umiejętności samodzielnego prowadzenia pracy naukowej.

Chciałabym podkreślić, że przedstawione przeze mnie wątpliwości i powyższe uwagi mają jedynie charakter polemiczny. Nie umniejszają one wartości naukowej rozprawy i są jedynie sugestią, którą Autorka może wykorzystać podczas przedstawiania rezultatów badań w przyszłości. Mimo poczynionych uwag, oceniam rozprawę wysoko. Moja recenzja jest jak najbardziej pozytywna.

Stwierdzam, że przedstawiona do recenzji Rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 13 ust. 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. zm.).

W związku z powyższym wnoszę do Rady Dyscypliny Nauki Medyczne Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu o dopuszczenie lek. Anny Kulikowskiej de Nałęcz do dalszych etapów przewodu doktorskiego.


dr hab. n. med. Agnieszka Bojarska-Junak, prof. uczelni