

Paulina Pilanc-Kudlek

**Wpływ inhibitora arginazy oraz peptydu RGD
na mikrośrodowisko nowotworu i odpowiedź na immunoterapię
z użyciem przeciwciała anti-PD-1 w mysim modelu glejaka**

Praca doktorska wykonana
w Pracowni Neurobiologii Molekularnej
Instytutu Biologii Doświadczalnej
im. M. Nenckiego PAN

PROMOTOR:

Prof. dr hab. Bożena Kamińska-Kaczmarek

Promotor pomocniczy:

Dr Aleksandra Ellert-Miklaszewska

Warszawa, 2025

Badania zawarte w niniejszej rozprawie finansowane były przez:

1. Narodowe Centrum Badań i Rozwoju (STRATEGMED2/265503/3/NCBR/2015)
2. Narodowe Centrum Nauki (OPUS13, 2017/25/B/NZ3/02483)

PODZIĘKOWANIA

Swoje szczególne podziękowania kieruję do **Pani Profesor dr hab. Bożeny Kamińskiej-Kaczmarek** za stworzenie znakomitych warunków do rozwoju naukowego w Pracowni Neurobiologii Molekularnej i pomoc podczas pisania pracy.

Ogromne podziękowania kieruję do Koleżanek i Kolegów z wyżej wspomnianej Pracowni w szczególności w stronę **dr Aleksandry Ellert-Miklaszewskiej** za nieocenioną pomoc i wsparcie zarówno w trakcie realizacji projektu jak i na późniejszych etapach pisania pracy, **dr Katarzynie Poleszak** za motywację do działania, krytyczne dyskusje oraz za codzienną dawkę śmiechu, **dr Salvadorowi Cyranowskiemu** za wprowadzenie do świata cytometrii przepływowej.

Serdeczne podziękowania kieruję również w stronę **dr Bartłomieja Gielniewskiego** za przygotowanie bibliotek NGS do sekwencjonowania oraz **dr Adrià Jaume Roura-Canalda** za analizy bioinformatyczne.

Chciałabym również podziękować wszystkim Członkom Pracowni Neurobiologii Molekularnej, w szczególności, dr Katarzynie Leszczyńskiej, dr Iwonie Ciechomskiej, dr Kamilowi Wojnickiemu, dr Karolinie Stępiak, dr Chinchu Jayaprakash, dr Annie Malik, dr Paulinie Szadkowskiej, lek. wet. Marii Pasierbińskiej, dr Annie Lenkiewicz, Paulinie Kamińskiej, Monice Dźwigońskiej, Zuzannie Łuczak oraz Karolowi Jackowi za tworzenie miłej atmosfery w pracy.

Najmocniejsze podziękowania kieruję w stronę swojej Rodziny i Przyjaciół.
Pracę tę dedykuję mojemu mężowi i synkowi.

Spis treści

1. WYKAZ SKRÓTÓW I SYMBOLI.....	7
2. STRESZCZENIE	9
3. ABSTRAKT.....	11
4. WSTĘP.....	13
4.1. Glejaki – Epidemiologia i klasyfikacja glejaków	13
4.2. Strategie terapeutyczne w leczeniu glejaków złośliwych	14
4.3. Immunosupresyjne mikrośrodowisko glejaków.....	16
4.3.1. Charakterystyka nacieku limfoidalnego w glejakach złośliwych	17
4.3.2. Komórki mieloidalne w mikrośrodowisku glejaka	18
4.3.3. Czynniki zaangażowane w rekrutację i aktywację komórek GAM	21
4.3.4. Enzymy zaangażowane w metabolizm aminokwasów niezbędnych dla limfocytów T.....	24
4.4. Terapie celujące w komórki odpornościowe w mikrośrodowisku nowotworu.....	25
4.4.1. Immunoterapia nowotworów	25
4.4.1.1. Przykłady immunoterapii biernych.....	27
4.4.1.2. Immunologiczne punkty kontrolne i ich inhibitory	28
4.4.2. Blokowanie napływu i przeprogramowania komórek mieloidalnych w glejakach.....	32
5. CEL PRACY	34
6. MATERIAŁY I METODY	36
6.1. Komórki mysiego glejaka GL261	36
6.1.1. Charakterystyka komórek GL261.....	36
6.1.2. Hodowla komórek i stosowane warunki doświadczalne.....	36
6.2. Model glejaka <i>in vivo</i>	37
6.2.1. Model zwierzęcy	37
6.2.2. Implantacja komórek glejaka do mózgu myszy	37
6.2.3. Implantacja pomp osmotycznych dozujących badany peptyd do mózgu myszy.....	38
6.2.5. Przyżyciowe obrazowanie bioluminescencyjne guzów tworzonych przez komórki GL261 tdT ⁺ luc ⁺ u myszy przy użyciu urządzenia Xtreme	40
6.2.6. Przyżyciowe monitorowanie wzrostu guza metodą obrazowania rezonansu magnetycznego	41
6.2.7. Postępowanie w końcowym punkcie doświadczenia - uśmiercenie i dysekcja mózgu w celu preparatyki materiału	42
6.2.8. Wyznaczanie objętości guzów na podstawie histologicznej oceny skrawków mózgu.....	42
6.3. Preparatyka tkanki mózgowej do analizy cytometrycznej i sortowania komórek ..	43

6.3.1. Przygotowanie pojedynczej zawiesiny komórek z mózgu myszy.....	43
6.3.2. Cytometria przepływowa.....	44
6.4. Izolacja RNA	48
6.5. Przygotowanie biblioteki mRNA i sekwencjonowanie RNA.....	49
6.6. Przetwarzanie i analiza danych	49
6.7. Barwienie immunofluorescencyjne.....	50
6.8. Oznaczenie stężenia L-argininy oraz OAT-1746 w osoczu i homogenatach mózgów.....	51
6.9. Ocena stabilności peptydu RGD	52
6.10. Pomiar stężenia cytokin w homogenatach mózgowych oraz we krwi	53
6.11. Analiza statystyczna.....	54
6.12. Programy graficzne.....	54
7.WYNIKI.....	55
7.1. Ocena przeciwnowotworowego działania inhibitora arginazy oraz jego wpływu na wzrost glejaka u myszy w połączeniu z przeciwciałem anty-PD-1	55
7.1.1. Określenie ekspresji <i>ARG1/ARG2</i> w próbkach ludzkich glejaków	55
7.1.2. Określenie typu komórek wykazujących ekspresję <i>Arg1</i> w mysim glejaku GL261.....	56
7.1.3. Ocena biodystrybucji i aktywności <i>in vivo</i> inhibitora arginazy OAT-1746 u myszy z glejakiem	57
7.1.4. Ocena działania OAT-1746 oraz przeciwciała anty-PD-1 podawanych jako monoterapie na wielkość guza w modelu glejaka u myszy.....	58
7.1.5. Zbadanie wpływu OAT-1746 oraz przeciwciała anty-PD-1 na wybrane elementy mikrośrodowiska glejaka	59
7.1.6. Ocena wpływu OAT-1746 oraz przeciwciała anty-PD-1 na wielkość guza.....	61
7.1.7. Wpływ OAT-1746 oraz przeciwciała anty-PD-1 na mikrośrodowisko glejaka .	62
7.1.8. Ocena poziomu cytokin pro- i przeciwzapalnych po podawaniu OAT-1746 oraz anty-PD-1 Ab.....	63
7.1.9. Wpływ podawania OAT-1746 z anty-PD-1 Ab na profil transkryptomiczny komórek <i>CD11b⁺</i> z myszy z glejakiem	64
7.2. Ocena wpływu peptydu RGD na mikrośrodowisko glejaka u myszy oraz zbadanie jego przeciwnowotworowego działania w połączeniu z przeciwciałem anty-PD-1 ..	67
7.2.1. Analiza ekspresji <i>SPP1</i> w próbkach ludzkich glejaków	67
7.2.2. Ocena stabilności peptydu RGD w pompie osmotycznej oraz jego biodystrybucji po podaniu doguzowym	68
7.2.4. Wpływ peptydu RGD na profil transkryptomiczny komórek <i>CD11b⁺</i>	70
7.2.5. Ilościowa ocena komórek <i>Arg1⁺</i> w mikrośrodowisku glejaka	72
7.2.6. Wpływ podawania peptydu RGD z przeciwciałem anty-PD-1 na wielkość guza oraz wagę zwierząt.....	73

7.2.7. Ocena poziomu cytokin pro- i przeciwzapalnych po podaniu RGD oraz anty-PD-1 Ab.....	76
7.2.8. Ocena wpływu podawania peptydu RGD z przeciwciałem anty-PD-1 na profil komórek układu odpornościowego w mikrośrodowisku glejaka	77
7.2.9. Wpływ peptydu RGD w połączeniu z przeciwciałem anty-PD-1 na profil transkryptomiczny komórek CD11b ⁺	83
8. DYSKUSJA.....	88
8.1. Modyfikacja immunosupresyjnego mikrośrodowiska złośliwych glejaków jako strategia terapeutyczna.	88
8.2. Przeciwnowotworowe działanie inhibitora arginazy w połączeniu z immunoterapią.....	90
8.3. Użycie peptydu blokującego szlak SPP1/integryny do wzmocnienia efektu immunoterapii z anty-PD-1 Ab.....	93
8.4. Perspektywy, wyzwania i krytyczna ocena możliwości użycia badanych strategii terapeutycznych w praktyce klinicznej.....	98
9. PODSUMOWANIE I WNIOSKI	102
10. PIŚMIENNICTWO	103
11. PUBLIKACJE Z UDZIAŁEM DOKTORANTKI.....	116

1. WYKAZ SKRÓTÓW I SYMBOLI

ACS (ang. *American Cancer Society*) - Amerykańskie Towarzystwo Walki z Rakiem
Arg1 (ang. *arginase 1*) – arginaza 1
ATCC (ang. *American Type Culture Collection*) – Amerykańska Kolekcja Hodowli Komórkowych
BBB (ang. *blood-brain barrier*) - bariera krew-mózg
BSA (ang. *bovine serum albumin*) – surowicza albumina wołowa
CED (ang. *convection-enhanced delivery*) - dostarczanie wzmocnione konwekcją
CD (ang. *cluster of differentiation*) – antygen różnicowania komórkowego (tym symbolem i odpowiednią cyfrą oznaczone są białka powierzchniowe komórek, głównie leukocytów)
CD45 (ang. *leukocyte common antigen*) – antygen panleukocytarny
COX-2 (ang. *cyclooxygenase 2*) – cyklooksygenaza 2
CSF (ang. *colony-stimulating factor*) – czynnik stymulujący tworzenie kolonii
CSFR (ang. *colony-stimulating factor receptor*) – receptor czynnika stymulującego tworzenie kolonii
DAPI (ang. *4',6-diamidino-2-phenylindole*) – 4',6-diamidyno-2-fenylindol
DC (ang. *dendritic cell*) – komórka dendrytyczna
DMEM (ang. *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) – pożywka Eagle'a w modyfikacji Dulbecco
DMSO (ang. *dimethyl sulfoxide*) – dimetylosulfotlenek
EGFR (ang. *epidermal growth factor receptor*) – receptor czynnika wzrostu naskórka
FBS (ang. *fetal bovine serum*) – płodowa surowica bydlęca
GAMs (ang. *glioma-associated microglia/macrophages*) – mikroglej/makrofagi związane z glejakiem
GBM (ang. *glioblastoma multiforme*) – glejak wielopostaciowy
G-CIMP (ang. *glioma CpG island methylator phenotype*) - fenotyp glejaka o zwiększonej metylacji wysp CpG
GFP (ang. *green fluorescent protein*) – białko zielonej fluorescencji
GM-CSF (ang. *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*) – czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów
GM-CSFR (ang. *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor*) – receptor czynnika stymulującego tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów
Iba1 (ang. *ionized calcium binding adaptor molecule 1*) – cząsteczka adaptorowa wiążąca jony wapnia
IDH (ang. *isocitrate dehydrogenase*) - dehydrogenaza izocytrynianowa
IFN (ang. *interferon*) - interferon
IL (ang. *interleukin*) - interleukina
IL R (ang. *interleukin receptor*) - receptor interleukiny
iNOS (ang. *inducible nitric oxide synthase*) – indukowalna syntaza tlenu azotu
Limfocyt Th (ang. *helper*) – limfocyt T pomocniczy
LPS (ang. *lipopolysaccharide*) - lipopolisacharyd
MDSC (ang. *myeloid derived suppressor cells*) – mieloidalne komórki supresorowe
MGMT - (ang. *methyl-guanine methyltransferase*) - metylotransferaza metyloguaniny
MMP (ang. *matrix metalloproteinase*) – metaloproteinaza macierzy zewnątrzkomórkowej
OUN (ang. *central nervous system*) - ośrodkowy układ nerwowy
PEG (ang. *polyethylene glycol*) glikol polietylenowy

PBMC (ang. *peripheral blood mononuclear cell*) – jednojądrzaste komórki krwi obwodowej

PBS (ang. *phosphate buffered saline*) – buforowany roztwór soli fizjologicznej

PDGF (ang. *platelet-derived growth factor*) – płytkopochodny czynnik wzrostu

PFA (ang. *paraformaldehyde*) – paraformaldehyd

SDS (ang. *sodium dodecyl sulfate*) – dodecylosiarczan sodu

SPP1 (ang. *secreted phosphoprotein 1*) – wydzielane ufosforylowane białko 1 (osteopontyna)

STAT (ang. *signal transducers and activators of transcription*) –przełączniki sygnału i aktywatory transkrypcji

TME (ang. *tumor microenvironment*) - mikrośrodowisko nowotworu

TLR2 (ang. *toll-like receptor*) – receptor toll-podobny 2

Wyspy CpG - regiony w genomie o podwyższonej zawartości dinukleotydów 5'-CpG-3' w stosunku do przeciętnej dla całego genomu

VEGF (ang. *vascular endothelial growth factor*) –czynnik wzrostu śródbłónka naczyń

VEGFR (ang. *vascular endothelial growth factor receptor*) – receptor czynnika wzrostu śródbłónka naczyń

WHO (ang. *World Health Organization*) – Światowa Organizacja Zdrowia

2. STRESZCZENIE

Glejak złośliwy z prawidłowym genem IDH1/2 (glioblastoma, GBM, IDH1/2 wt) jest najczęstszym i najbardziej agresywnym nowotworem mózgu u dorosłych, w przypadku którego obecne terapie nie są skuteczne, a większość guzów nawraca w ciągu kilku miesięcy. Rozwój nowotworu wiąże się z osłabieniem obrony przeciwnowotworowej gospodarza. Celem immunoterapii jest przywrócenie tej odpowiedzi, a inhibitory immunologicznych punktów kontrolnych, np. przeciwciała przeciw cząsteczce PD-1 (anty-PD-1), oferują możliwość całkowitego wyeliminowania nowotworu. Jednak pacjenci z GBM słabo reagują na immunoterapie, ponieważ guzy charakteryzują się słabym naciekiem funkcjonalnych limfocytów T i komórek NK. Gromadzące się w GBM komórki mieloidalne (rezydentny mikroglej i makrofagi obwodowe, glioma associated myeloid cells - GAMs) ulegają przeprogramowaniu i wspomagają nowotwór oraz działają immunosupresyjnie w mikrośrodkowisku guza. Jednym z czynników odpowiedzialnych za te procesy jest wydzielane przez glejaka białko SPP1 (secreted phosphoprotein1). Celem mojej pracy było opracowanie nowych strategii reaktywacji przeciwnowotworowej odpowiedzi w złośliwym glejaku i uwrażliwienie guza na działanie przeciwciał anty-PD-1. Strategie te zakładają przeprogramowanie fenotypu komórek GAM. Wykorzystując syngeniczny model glejaka u myszy, zastosowałam dwa podejścia terapeutyczne: i) blokowanie aktywności arginazy 1 (Arg1) za pomocą OAT-1746 — nowego, selektywnego i małowcząsteczkowego inhibitora enzymu, oraz ii) zablokowanie działania Spp1 za pomocą krótkiego peptydu blokującego oddziaływanie SPP1-integriny. Aktywacja Arg1 w GAMs prowadzi do wyczerpania L-argininy, niezbędnej przy intensywnej proliferacji komórek T i NK, podczas gdy aktywacja receptorów integrynowych przez Spp1 uczestniczy w indukcji pronowotworowego fenotypu GAMs. Wpływ immunomodulatorów na wzrost glejaka GL261 *in vivo* oceniano za pomocą rezonansu magnetycznego lub platformy do obrazowania przyżyciowego Xtreme. Scharakteryzowano mikrośrodkowisko glejaka po podaniu immunomodulatorów wykorzystując wieloparametryczną analizę cytometrii przepływową oraz profilowanie transkryptomyczne (RNAseq) izolowanych komórek CD11b⁺. Oceniono skuteczność przeciwnowotworową immunomodulatorów podanych samodzielnie oraz w połączeniu z

blokadą PD-1. Doustne podawanie OAT-1746 nie miało wpływu na skład komórek układu odpornościowego w mikrośrodowisku glejaka, jednak indukowało zmiany transkryptyczne w komórkach CD11b⁺ z mózgów myszy otrzymujących ten inhibitor. Podawanie OAT-1746 z przeciwciałem anti-PD-1 doprowadziło do spowolnienia wzrostu nowotworu. Podawany doguzowo peptyd RGD skutecznie blokował przeprogramowanie GAMs w kierunku fenotypu wspierającego glejaka, ale nie wpływał na wielkość guza. Zastosowanie peptydu RGD w połączeniu z przeciwciałem anti-PD-1 zmieniało skład i funkcjonalność komórek układu odpornościowego, wzmacniało odpowiedzi prozapalne, co doprowadziło do zmniejszenia wielkości guza. Wyniki badań wskazują, że testowane immunomodulatory zmieniają mikrośrodowisko glejaka, umożliwiają napływ efektorowych limfocytów i wspomagają działanie immunoterapii z inhibitorem immunologicznych punktów kontrolnych.

3. ABSTRAKT

Malignant glioma with a wild-type IDH1/2 (glioblastoma, GBM, wt-IDH1/2) is the most common and aggressive brain tumor in adults. Current therapies for GBM are not effective and most tumors recur within months. The development of tumor is associated with deficits of the host's antitumor defense. The goal of immunotherapy is to restore the anti-tumor immune response, and immune checkpoint inhibitors offer the potential to completely eradicate cancer. However, GBM patients respond poorly to immunotherapies because the tumors are characterized by meager infiltration of functional T lymphocytes and NK cells. Myeloid cells accumulating in the GBM (including resident microglia and peripheral macrophages, collectively known as glioma associated myeloid cells - GAMs) are reprogrammed to support the tumor and exert an immunosuppressive effect in the tumor microenvironment. One of the factors responsible for these processes is the SPP1 (secreted phosphoprotein 1) protein secreted by glioma. The aim of this study was to develop new strategies to reactivate the anti-tumor response in malignant gliomas and to sensitize the tumor to the action of anti-PD-1 antibodies. These strategies involve reprogramming the phenotype of GAMs.

Using a syngeneic model of glioma in mice, two therapeutic approaches were employed: i) blocking the activity of arginase 1 (Arg1) using OAT-1746 - a new, potent and selective, small-molecule inhibitor of the enzyme, and ii) preventing the action of Spp1 using a short peptide that blocks the Spp1-integrin interaction. Activation of Arg1 in GAMs leads to depletion of L-arginine, a nutrient required for T and NK cell proliferation, while activation of integrin receptors by Spp1 contributes to the induction of the pro-tumor phenotype of GAMs. The effects of immunomodulators on GL261 glioma growth *in vivo* were assessed using magnetic resonance imaging or the Xtreme intravital imaging. The glioma microenvironment following immunomodulator administration was characterized using multiparametric flow cytometry analysis and transcriptomic profiling (RNAseq) of isolated CD11b⁺ cells. The antitumor efficacy of immunomodulators administered alone or in combination with PD-1 blockade was assessed. Oral administration of OAT-1746 had no effect on the immune cell composition in the glioma microenvironment, but induced transcriptomic changes in CD11b⁺ cells immunosorted from the brains of inhibitor-treated mice. Administration of OAT-1746 with anti-PD-1 antibody reduced tumor growth. Intratumorally delivered RGD peptide

effectively blocked the reprogramming of GAMs towards a glioma-supporting phenotype, but did not affect tumor size. The use of the RGD peptide in combination with the anti-PD-1 antibody changed the composition and functionality of immune cells and enhanced pro-inflammatory responses, which led to a reduction in tumor size. The presented results indicate that the tested immunomodulators change the glioma microenvironment, enable the influx of effector lymphocytes and support the action of immune checkpoint inhibitor immunotherapy.

4. WSTĘP

4.1. Glejaki – Epidemiologia i klasyfikacja glejaków

Glejaki złośliwe to najczęściej występujące pierwotne nowotwory ośrodkowego układu nerwowego (OUN) (Alcantara i wsp., 2016). Światowa Organizacja Zdrowia (WHO) klasyfikuje glejaki według czterech stopni złośliwości, przy czym stopień 1 (G1) wg WHO opisuje nowotwory łagodne, a stopień 4 (G4) guzy najbardziej agresywne. Glejaki rozwijają się poprzez akumulację mutacji w neuronalnych komórkach macierzystych lub glejowych komórkach progenitorowych. Glejaki stanowią 2% wszystkich przypadków nowotworów u człowieka i 75% pierwotnych guzów mózgu u dorosłych (Ostrom i wsp., 2020). W Polsce rocznie odnotowuje się około 1300 nowych przypadków glejaków, z czego 600 stanowią glejaki o wysokim stopniu złośliwości, w tym najczęstszy i szczególnie agresywny glejak złośliwy G4 z prawidłowym genem IDH1/2 (ang. *glioblastoma*, GBM) (na podstawie danych Narodowego Funduszu Zdrowia). Glejaki złośliwe (ang. *high grade gliomas*) charakteryzują się rozlanym wzrostem i silnie infiltrują parenchymę mózgu, co utrudnia resekcję chirurgiczną guza, prowadząc w krótkim czasie do wznowy. Glejaki o niskim stopniu złośliwości (ang. *low grade gliomas*, LGG) wykrywa się zazwyczaj u młodych dorosłych osób, z medianą czasu przeżycia wynoszącą 7 lat (Claus i wsp., 2015), podczas gdy czas przeżycia pacjenta z GBM wynosi około 14 miesięcy (Grossman i wsp., 2010).

W odpowiedzi na rosnącą ilość danych dotyczących różnorodności molekularnej glejaków w 2021 roku WHO przedstawiła nowy system klasyfikacji tych nowotworów. System ten uwzględnia zarówno morfologię guzów, jak i ich molekularną charakterystykę. Dwie najistotniejsze cechy molekularne uwzględnione w systemie to: mutacja w genach dehydrogenazy izocytrynianowej (ang. *isocitrate dehydrogenase*, IDH1/2) oraz kodelecja krótkiego ramienia chromosomu 1 (tj. 1p) oraz długiego ramienia chromosomu 19 (tj. 19q). Mutacja *IDH* jest związana ze zwiększoną metylacją histonów oraz hipermetylacją wysp CpG (regiony genomu bogate w nukleotydy cytozynowe i guanidynowe następujące bezpośrednio po sobie); cechę tę określa się jako fenotyp glejaka o zwiększonej metylacji wysp CpG (g-CIMP, ang. *glioma CpG island methylator phenotype*). Obecny system WHO rozróżnia 3 typy glejaków rozlanych u dorosłych (ang. *adult-type diffuse glioma*;): glejak złośliwy z prawidłowym IDH (*glioblastoma*

IDH-wild type), gwiaździak z mutacją IDH (*astrocytoma* IDH-mutant), skąpodrzewiak z mutacją IDH i kodelecją 1p/19q (*oligodendroglioma*, IDH-mutant, and 1p/19q-codeleted). Glejaki z mutacją IDH uważane są za “nowotwory wtórne” wywodzące się ze zmian mniej złośliwych i odznaczają się lepszą prognozą dla pacjenta. Glejaki bez mutacji IDH są z reguły bardziej agresywne. Kodelecja 1p19q jest zwykle związana z większą wrażliwością nowotworu na radio i chemioterapię. Dodatkową cechą molekularną glejaków często uwzględnianą w procesie wyboru terapii jest aktywność genu *MGMT* (kodującego metylotransferazę metyloguaniny), enzymu naprawiającego DNA, który jest bezpośrednio związany z wrażliwością na chemioterapię lekami alkilującymi DNA. Metylacja promotora *MGMT* powoduje wyciszenie ekspresji tego genu w glejakach, co warunkuje lepszą odpowiedź na chemioterapię temozolomidem oraz wyższą przeżywalność pacjentów (Bagley i wsp., 2022; Van Solinge i wsp., 2022).

4.2. Strategie terapeutyczne w leczeniu glejaków złośliwych

Glejak złośliwy wciąż stanowi wyzwanie dla współczesnej medycyny z uwagi na brak skutecznych metod leczenia (Tran i wsp., 2010; Wang i wsp., 2019). Standardowa terapia, tzw. protokół Stupp, obejmuje maksymalną dopuszczalną resekcję, radioterapię i chemioterapię z temodalem (temozolomide, TMZ) (Stupp i wsp., 2005). Zależnie od charakterystyki histopatologicznej i molekularnej danego nowotworu, a także stanu zdrowia pacjenta pooperacyjnie dobierana jest odpowiednio radio lub/i chemioterapia. Poza właściwą terapią przeciwnowotworową stosuje się także leczenie wspomagające mające na celu głównie ograniczenie obrzęku mózgu (sterydowe leki przeciwzapalne) oraz ataków padaczkowych (leki przeciwdrgawkowe).

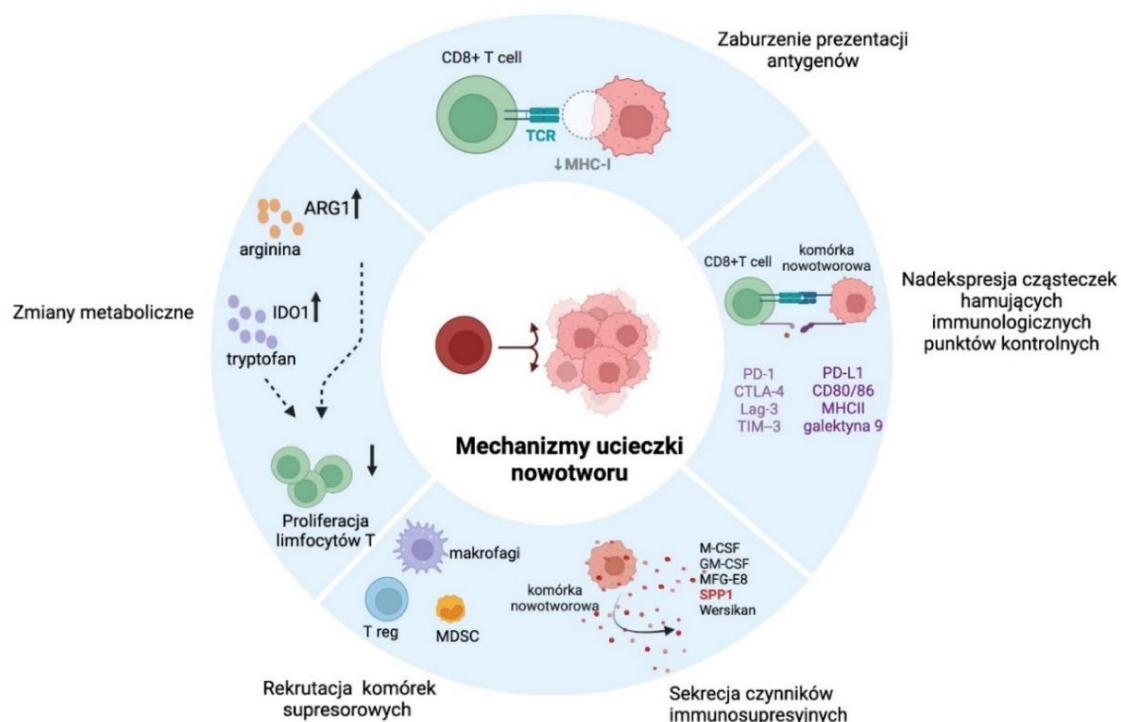
Wiele czynników przyczynia się do niepowodzenia zarówno konwencjonalnych, jak i nowatorskich terapii w leczeniu glejaków. Lokalizacja nowotworu w ważnych funkcjonalnie obszarach mózgu, ograniczająca dostęp chirurgiczny, stanowi jeden z nich. Ponadto rozlany charakter guza i jego specyficzna struktura morfologiczna stanowią dodatkowe utrudnienia w rozróżnieniu patologicznych i zdrowych tkanek w trakcie resekcji. Obecność bariery krew-mózg (ang. *blood-brain barrier*, BBB) ogranicza dostęp większości chemioterapeutyków, zawężając znacznie wybór leków, a heterogenność molekularna i mechanizmy oporności na leczenie blokują skuteczną eliminację nowotworu (Noorani i wsp. 2023). Warto przy tym dodać, że BBB utrudnia również kontakt z układem odpornościowym i ekspozycję na potencjalne nowe antygeny z

komórek nowotworowych. Ponadto, BBB nie jest jednorodną strukturą we wszystkich obszarach zdrowego mózgu, a w przypadku glejaków może być jeszcze bardziej zróżnicowana i podlegać modyfikacjom w zależności od podtypu guza. W przypadku rozlanych glejaków złośliwych, pomimo obecnych obszarów BBB o zwiększonej przepuszczalności (zwykle w centrum guza), problem stanowią obszary, gdzie nowotwór penetruje zdrową tkankę mózgu (tam BBB pozostaje nieprzepuszczalna). Z tego powodu środki terapeutyczne nie osiągają miejsca docelowego działania na obrzeżach guza (Noorani i wsp., 2023).

Obserwowany w ostatnich latach znaczny postęp w rozwoju technik chirurgicznych, radiologicznych, jak i metod biologii molekularnej, w tym wielkoskalowych technik pozwalających na ocenę właściwości pojedynczych komórek, a także coraz lepsze zrozumienie oddziaływań między komórkami guza, przyczyniły się do opracowania szeregu nowatorskich strategii w leczeniu złośliwych nowotworów mózgu, starających się ominąć dotychczasowe wyzwania terapeutyczne (Jain 2018). Należą do nich: celowana chemioterapia (ang. *targeted chemotherapy*), metody ułatwiające obejście BBB i celujące w obrzeża nowotworu, innowacyjna radioterapia, chirurgiczne techniki lokalnej destrukcji guza, immunoterapia oraz terapia genowa i komórkowa (Van Solinge i wsp., 2022). Szczególnie duże nadzieje wiąże się z zastosowaniem różnych rodzajów immunoterapii (szczegółowo opisanych w punkcie 4.4.1.), które z powodzeniem wykorzystuje się w leczeniu innych typów nowotworów. Jak dotąd zawodzą one niestety w przypadku glejaków złośliwych (Rocha i wsp., 2023). Glejaki to nowotwory o stosunkowo niskiej liczbie mutacji ocenianej wskaźnikiem TMB (ang. *tumor mutational burden*) i przez to ograniczonej liczbie nowych antygenów, które pozwalałyby na wywołanie lub przywrócenie odpowiedzi odpornościowej. Ponadto istotną przeszkodą dla działania immunoterapii jest mikrośrodowisko nowotworu (ang. *tumor microenvironment*, TME), czyli złożony ekosystem komórek i składników macierzy zewnątrzkomórkowej, w którym funkcjonują mechanizmy wspierające wzrost nowotworu oraz blokujące rozpoznanie i aktywną eliminację komórek nowotworowych przez układ odpornościowy.

4.3. Immunosupresyjne mikrośrodowisko glejaków

Oddziaływania między mikrośrodowiskiem a komórkami nowotworowymi odgrywają ważną rolę w patogenezie i rozwoju nowotworu (Sica i wsp., 2012). Mikrośrodowisko glejaka stanowią zarówno komórki glejowe, komórki śródbłónka i pericyty, jak i rezydentne i obwodowe komórki układu odpornościowego (Gierzyng i wsp., 2017). Komórki odpornościowe naciekające guz w zróżnicowany sposób wpływają na jego rozwój. Niektóre z nich, tak jak cytotoksyczne limfocyty T lub komórki NK, zdolne są do zabijania komórek nowotworowych. W złośliwych glejakach funkcjonalnych komórek T i NK jest jednak niewiele. Całkowicie odmienną rolę przyjmują licznie gromadzące się w guzie komórki mieloidalne (Ellert-Miklaszewska i wsp., 2018; Hambardzumyan i wsp., 2016). W odpowiedzi na sygnały otrzymywane od komórek nowotworowych, stają się one źródłem proangiogennych cytokin, enzymów proteolitycznych i czynników wzrostu, tworząc warunki wspierające wzrost guza. Prowadzi to m.in. do nasilenia neoangiogenezy, ułatwionej penetracji komórek nowotworowych w zdrowej tkance w przebudowanej macierzy zewnątrzkomórkowej, tworzenia nisz dla macierzystych komórek nowotworowych czy aktywacji szlaków prożyciowych sprzyjających oporności na leczenie. Ponadto, dochodzi do wytworzenia stanu lokalnej i systemowej immunosupresji w wyniku zaburzenia prezentacji antygenów, nadekspresji cząsteczek hamujących immunologicznych punktów kontroli oraz nagromadzenia w guzie komórek supresorowych, które są źródłem enzymów, cytokin i innych mediatorów hamujących aktywność limfocytów T (Liu i wsp., 2024). Kluczowe mechanizmy, które odpowiadają za powstawanie takiego środowiska w glejakach złośliwych i ułatwiają ucieczkę komórek nowotworowych spod nadzoru układu odpornościowego zostały przedstawione na poniższym schemacie, a wybrane z nich opisano szerzej w poniższych sekcjach.



Schemat 1. Mechanizmy blokowania odpowiedzi przeciwnowotworowej układu odpornościowego w gliomach. Objasnienia symboli i procesow w tekście.

4.3.1. Charakterystyka nacieku limfoidalnego w gliomach złośliwych

Powodzenie strategii immunoterapeutycznych opiera się na prawidłowym funkcjonowaniu cytotoksycznych limfocytów T, stąd też próby zastosowania tego typu leczenia w GBM doprowadziły do lepszego scharakteryzowania tej populacji komórek w gliomach (Prins i wsp., 2011). Komórki te uczestniczą w reakcji odpornościowej organizmu we wczesnych stadiach zmian nowotworowych. Limfocyty T cytotoksyczne wraz z komórkami NK odpowiadają za eliminację komórek nieprawidłowych poprzez indukcję apoptozy w skutek uwalniania perforyny, granzymów A i B oraz granulizyny z ziaren cytolitycznych lub przez sekrecję czynnika martwicy nowotworu (TNF α) oddziałującego z receptorem (TNF-R) w błonie komórki docelowej (Zhou 2010). Limfocyty T pomocnicze (Th; CD4 $^{+}$) są komórkami wspomagającymi odpowiedź typu humoralnego i komórkowego. Limfocyty Th1 produkują interleukinę (IL)-2, stymulującą między innymi cytotoksyczność limfocytów. Z kolei limfocyty Th2 produkują immunosupresyjne cytokiny, takie jak IL-4, IL-5 oraz IL-10 (Zamarron i wsp., Chen 2011). Limfocyty T CD3 $^{+}$ są główną populacją komórek limfoidalnych w GBM, jednakże ich odsetek to jedynie 0,25% wszystkich komórek guza wyizolowanych z próbek biopsji

ludzkich glejaków. W glejakach złośliwych cytotoksyczne limfocyty T CD8⁺ stanowią mniej niż jedną czwartą całkowitej puli limfocytów T CD3⁺ (Han i wsp., 2016). W porównaniu do glejaków o niskim stopniu złośliwości odsetek komórek CD8⁺ w nacieku limfocytarnym spada wraz ze wzrostem stopnia złośliwości guza, przy jednoczesnym zwiększaniu się liczby komórek CD4⁺ (Kmieciak i wsp., 2013). Ponadto wykazano, że większość komórek CD4⁺ infiltrujących GBM ma właściwości immunosupresyjne i hamuje odpowiedź komórkową, przyczyniając się do faktu, że obecne w guzie nieliczne limfocyty CD8⁺ nie są w stanie pełnić swoich cytotoksycznych funkcji (Waziri i wsp., 2008).

Komórkami immunosupresyjnymi wśród populacji CD4⁺ są limfocyty T regulatorowe (Treg), charakteryzowane jako komórki CD4⁺CD25^{high}FoxP3⁺ (Giles i wsp., 2023). W GBM wydzielane przez nowotwór cytokiny, jak np. CCL22 (ang. *C-C motif chemokine 22*), mogą ułatwiać rekrutację Treg do mikrośrodowiska guza (Crane i wsp., 2012). Według różnych doniesień, Treg stanowią do 14% wszystkich limfocytów CD4⁺ w GBM (Jacobs i wsp., 2010). Profilowanie ekspresji genów w próbkach ludzkich GBM wykazało zwiększoną ekspresję markerów uznawanych za związane z naciekiem limfocytów Treg, takich jak np. FOXP3 (ang. *forkhead box P3*), IL-2Rα/CD25 (ang. *membrane-resident interleukin-2 receptor α*) (Wainwright i wsp., 2013). Wspierające nowotwór działanie Treg w glejakach wynika z wydzielania czynników, takich jak transformujący czynnik wzrostu beta (TGF-β, ang. *transforming growth factor β*), czy interleukina IL-10, które hamują proliferację i aktywność limfocytów T w mikrośrodowisku nowotworu (Tanaka i wsp., 2017). Obecny w mikrośrodowisku TGF-β indukuje produkcję czynnika transkrypcyjnego FoxP3 w naiwnych limfocytach CD4⁺CD25⁻, a następnie ich dojrzewanie w kierunku komórek CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ (Andersson i in. 2008). Limfocyty Treg hamują także wydzielanie IL-12 przez limfocyty efektorowe, która jest istotna dla ich proliferacji i aktywności cytotoksycznej. Treg mogą także ograniczać proliferację prezentujących antygen limfocytów B (Y. Wang i in. 2024).

4.3.2. Komórki mieloidalne w mikrośrodowisku glejaka

Mikroglej to główna populacja komórek mieloidalnych występująca w ośrodkowym układzie nerwowym. Komórki te stanowią około 5-10% całej populacji komórek nie-neuronalnych. Mikroglej uczestniczy w regulacji tworzenia nowych synaps

i kontroluje liczbę komórek nerwowych w rozwoju OUN (Blank i Prinz 2013). Komórki mikrogleju wywodzą się z progenitorów mieloidalnych powstających w woreczku żółtkowym, które we wczesnym etapie rozwoju organizmu zasiedlają OUN (Kierdorf i wsp. 2013). Komórki mikrogleju wraz z makrofagami okołonaczyniowymi i makrofagami opon mózgowych (BAMs, ang. *CNS border-associated macrophages*) odpowiedzialne są za utrzymanie homeostazy w OUN. Różnicowanie mikrogleju i BAMs regulowane jest przez czynniki transkrypcyjne PU.1 i IRF8 (Van Hove i wsp. 2019).

W warunkach prawidłowych komórki mikrogleju charakteryzuje obecność rozgałęzionych wypustek, które aktywnie penetrują mikrośrodowisko. Aktywowany mikroglej zmienia swoją morfologię z rozgałęzionej na ameboidalną, czego przejawem jest zanik wypustek cytoplazmatycznych oraz powiększenie ciała komórki (Hanisch i Kettenmann 2007). Do aktywacji mikrogleju, podobnie jak makrofagów obwodowych, dochodzi w obecności patogenów, bodźców stresowych czy uszkodzenia tkanek. Możemy wyróżnić dwa główne typy aktywacji tych komórek: prozapalny oraz immunosupresyjny. Mikroglej aktywowany prozapalnie zaangażowany jest w odpowiedź na infekcje lub uszkodzenie komórek (Fairweather i Cihakova 2009). Komórki po aktywacji prozapalnej wykazują zwiększoną produkcję mediatorów stanu zapalnego, takich jak reaktywne formy tlenu, tlenek azotu (NO), czynnik chemotaktyczny monocytów 1 (MCP-1, ang. *monocyte chemoattractant protein-1*), białko zapalne makrofagów (MIP-1, ang. *macrophage inflammatory protein-1*) czy cytokin prozapalnych, np. IL-1, IL-6, IL-12, IL-23 i TNF α (ang. *tumor necrosis factor α*) (Mantovani, Bonecchi, i Locati 2006). Aktywowany zapalnie mikroglej charakteryzuje się podwyższoną ekspresją cząsteczek głównego układu zgodności tkankowej klasy II (MHCII, ang. *major histocompatibility complex class II*) i ekspresją białek CD80 i CD86 kostymulujących limfocyty T w trakcie prezentacji antygenu (Mantovani i Sica 2010). Aktywacja mikrogleju w kierunku komórek immunosupresyjnych obserwowana jest w procesach regeneracyjnych po zapaleniu, gojeniu ran, infekcjach pasożytniczych oraz w chorobach nowotworowych. Mikroglej o fenotypie immunosupresyjnym wykazuje dużą aktywność fagocytarną i zaangażowany jest także w usuwanie komórek apoptotycznych (Murray i Wynn 2011). Ponadto mikroglej i makrofagi typu immunosupresyjnego mają zwiększoną ekspresję receptorów błonowych, takich jak: receptor mannozowy (MR, ang. *mannose receptor*) CD206, CD14, CD209 i receptorów zmiataczy (ang. *scavenger receptors*) CD163 i CD204 (Tripathy i wsp., 2024).

Dodatkowo w komórkach tych dochodzi do indukcji ekspresji arginazy-1, która konkuruje o wspólny substrat, L-argininę z indukowalną syntazą tlenku azotu (iNOS, ang. *inducible nitric oxide synthase*), co w konsekwencji obniża ilość NO produkowanego przez komórki. Wysoka aktywność arginazy ogranicza ponadto dostępność L-argininy dla limfocytów T, co negatywnie wpływa na ich proliferację i proces aktywacji. Arginaza-1 jest ważnym markerem fenotypu immunosupresyjnego komórek mieloidalnych, a jej rolę dokładniej opisano w punkcie 4.3.4. Należy podkreślić, że podział na stany aktywacji: prozapalny oraz immunosupresyjny jest bardzo uproszczony i obejmuje jedynie dwa skrajne typy aktywacji. Coraz bardziej powszechne jest stosowanie klasyfikacji opisowej, ze szczególnym uwzględnieniem źródła izolacji komórek, warunków hodowli, typu stymulacji oraz przeprowadzanej analizy (Martinez i wsp., 2014; Walentynowicz i wsp., 2018).

Na podstawie typowych markerów powierzchniowych mikroglej trudno jest odróżnić od naciekających makrofagów obwodowych pochodzących ze szpiku kostnego, dlatego też komórki mieloidalne w guzie określa się terminem mikroglej/makrofagi związane z glejakiem (GAMs, ang. *glioma-associated microglia/macrophages*). Wyniki badań z wykorzystaniem technologii transkryptomiki pojedynczych komórek (ang. *single-cell transcriptomics*, scRNAseq) pokazały, że różne typy komórek mieloidalnych oraz podtypy funkcjonalne (m.in. makrofagi fagocytykujące, makrofagi immunosupresyjne, prozapalne monocyty z sygnaturą interferonową) są obecne w glejakach doświadczalnych. GAMs są dominującą populacją naciekających glejaki komórek odpornościowych, stanowiącą około 30–40% komórek w GBM i odgrywają ważną rolę w rozwoju guza. Wykazano, że komórki te wchodzić we wzajemne interakcje z komórkami nowotworowymi, stymulując wzrost i progresję guza (Ochocka i wsp., 2021, 2023). GAMs mają osłabioną zdolność do prezentowania antygeny spowodowaną obniżoną ekspresją cząsteczek MHCII i obniżoną ekspresją cząsteczek kostymulujących CD80 i CD86, co zmniejsza ich zdolność do aktywacji limfocytów T. Wysoka ekspresja liganda Fas (FasL) w GAMs może prowadzić do indukcji apoptozy w limfocytach T cytotoksycznych (H. Lin i in. 2024).

Źródłem GAMs mogą być także mieloidalne komórki supresorowe (MDSCs, ang. *myeloid derived suppressor cells*), będące heterogenną grupą niedojrzałych komórek mieloidalnych. MDSCs wywodzą się z komórek progenitorowych linii mieloidalnej, powstają w odpowiedzi na przewlekłe stany zapalne w skutek zaktywowanej

hematopoezy i pod względem fenotypu oraz morfologii przypominają niedojrzałe granulocyty i monocyty (Sarantopoulos i wsp., 2024). U ludzi, MDSC wykazują ekspresję białek powierzchniowych charakterystycznych dla komórek linii mieloidalnej, takich jak CD33, CD11b i CD34, nie wykazując przy tym ekspresji HLA-DR. U myszy, MDSC charakteryzuje się jako komórki CD11b⁺, o niskiej lub z brakiem ekspresji MHC klasy II (np. I-A/I-E^{niski/-}) oraz niosące na powierzchni cząsteczki Ly6C i/lub Ly6G. W zależności od poziomu ekspresji cząsteczek Ly6C i Ly6G (u myszy), komórki te dzieli się na dwa podtypy. Monocytarne MDSC (M-MDSCs, ang. *monocytic-MDSCs*) o fenotypie CD11b⁺Ly6G⁻Ly6C^{wysoki} mają morfologię zbliżoną do monocytów. Granulocytarne MDSCs (G-MDSCs, ang. *granulocytic-MDSCs*) lub wielojądrzaste MDSCs (PMN-MDSCs ang. *polymorphonuclear-MDSCs*) o fenotypie CD11b⁺Ly6G⁺Ly6C^{niski} morfologicznie przypominają granulocyty. U człowieka rozróżnienie na M-MDSC i PMN-MDSC możliwe jest w oparciu o obecność na powierzchni, odpowiednio, białek CD14 i CD15. Podstawowe mechanizmy immunosupresyjnego działania są jednak wspólne dla obu podtypów komórek MDSCs (Marvel i wsp., 2015). MDSCs produkują m.in. IL-10, która hamuje aktywność przeciwnowotworową limfocytów T cytotoksycznych, komórek dendrytycznych oraz komórek NK. Innym mechanizmem odpowiedzialnym za immunosupresyjne działanie MDSCs jest wysoka ekspresja arginazy-1, która powoduje deplecję L-argininy w mikrośrodkowisku nowotworu przez co hamuje proliferację limfocytów T cytotoksycznych (De Leo i wsp., 2020).

4.3.3. Czynniki zaangażowane w rekrutację i aktywację komórek GAM

Gromadzenie się GAMs w głąkach oraz ich przeprogramowanie w kierunku komórek wspierających wzrost guza regulowane są przez liczne białka wydzielane przez komórki głąka. Jednym z pierwszych opisanych chemoatraktantów była chemokina CCL2/MCP-1 należąca do rodziny białek chemotaktycznych monocytów (MCPs, ang. *monocyte chemotactic proteins*). Wiązanie MCP-1 do receptora CCR2 (ang. *C-C motif receptor2*) stymuluje migrację komórek układu odpornościowego mikrogleju/makrofagów, monocytów, komórek NK i limfocytów T. Podwyższoną ekspresję MCP-1 wykryto w wielu nowotworach, w tym w głąku złośliwym (Ye i in. 2021). Inny chemoatraktant – CCL7/MCP-3, poprzez wiązanie się do receptorów: CCR1, CCR2 i CCR3 (ang. *chemokine CC motif receptors*) – podobnie jak MCP-1 – stymuluje chemotaksję mikrogleju, makrofagów, monocytów, limfocytów T, komórek NK i DC.

Innym czynnikiem odpowiedzialnym za nagromadzenie się GAMs w glejakiach jest czynnik wzrostu hepatocytów/czynnik rozproszony HGF/SF (ang. *hepatocyte growth factor/scatter factor*). Podwyższoną ekspresję tego białka wykrywano zarówno w komórkach glejaków, jak i GAMs izolowanych z guzów złośliwych (Lin i wsp., 2023). Ponadto wśród czynników wydzielanych przez komórki glejaka i zaangażowanych w przeprogramowanie odpowiedzi mikrogleju/makrofagów zidentyfikowano: czynnik troficzny pochodzenia glejowego (GDNF, ang. *glial-derived neurotrophic factor*), czynnik stymulujący kolonię makrofagów (M-CSF1, ang. *macrophage colony stimulating factor*), czynnik stymulujący kolonię granulocytów i makrofagów (GM-CSF, ang. *granulocyte-macrophages colony stimulating factor*) (Sielska i wsp., 2020) a także osteopontynę (ang. *osteopontin*, SPP1, ang. *secreted phosphoprotein-1*), laktadherynę, periostynę i wersikan (Ellert-Miklaszewska i wsp., 2018; Giering i wsp., 2017; Hambardzumyan i wsp., 2016).

Spp1 należy do małych, glikozylowanych białek oddziałujących z integrzynami, zaliczanych do rodziny SIBLINGS (ang. *small integrin-binding ligand N-linked glycoproteins*). Występuje w wielu tkankach i jej ekspresja jest wykrywana w wielu komórkach należących do układu odpornościowego takich jak: makrofagi, neutrofile, komórki dendrytyczne, komórki NK oraz limfocyty B i T. Białko to odgrywa kluczową rolę w takich procesach fizjologicznych jak: modelowanie kości, angiogeneza, regulacja migracji i adhezji komórkowej, a także w stymulacji odpowiedzi odpornościowej. Spp1 jest cytokiną pro-zapalną jak i bierze udział w hamowaniu odpowiedzi zapalnej (Lin i in. 2023). Tak szerokie spektrum procesów, w które zaangażowana jest Spp1, wynika w dużej mierze z budowy tego białka, która umożliwia oddziaływanie z określonymi receptorami, obecnymi na wielu typach komórek. W warunkach fizjologicznych Spp1 jest utrzymywana na niskim poziomie, a jej ekspresja wzrasta w procesie nowotworzenia. Spp1 zawiera motyw RGD (arginina–glicyna–asparaginian) oddziałujący z integrzynami $\alpha\beta1$, $\alpha\beta3$, $\alpha\beta5$, $\alpha\beta6$, $\alpha8\beta1$ i $\alpha5\beta1$ oraz miejsca wiązania receptora CD44. Integryny te są obecne m. in. na komórkach śródbłonna, fibroblastach, komórkach mięśni gładkich i komórkach układu odpornościowego (Kijewska i in. 2017).

W mysim modelu glejaka wykryto wysoką ekspresję genu *Spp1*. Ponadto ekspresja *SPP1* w ludzkich glejakiach korelowała ze stopniem złośliwości, a także ze złymi prognozami klinicznymi (Szulzewsky i wsp., 2015; Kijewska i wsp. 2017). Źródłem podwyższonej ekspresji *SPP1* w glejakiach są komórki nowotworowe, w tym

komórki o cechach macierzystych komórek nowotworowych (Kijewska i wsp., 2017), ale także towarzyszące im komórki zrębu, tj. astrocyty (Pietras i wsp., 2014) i mikroglej (Gabrusiewicz i wsp., 2016), obecne w mikrośrodkowisku nowotworu. Spp1 stymuluje proliferację oraz inwazyjność komórek nowotworowych, a także proces angiogenezy, w czym pośredniczą receptory integrynowe $\alpha\beta 1,3,5$ wiążące specyficzny motyw aminokwasowy RGD (Lin i in. 2023). Różne modyfikacje postranslacyjne Spp1 wskazują na jej pleiotropową rolę, a także odmienne funkcje. Istotną modyfikacją, która dominuje w tkance nowotworowej jest proteoliza przy udziale trombiny i metaloproteaz macierzy zewnątrzkomórkowej (MMP3 i MMP7, ang. *matrix metalloproteinase-3 and 7*), co prowadzi do uwolnienia fragmentu białka o silnym działaniu pro-nowotworowym i stymulującym immunosupresyjny fenotyp GAMs (Ellert-Miklaszewska i wsp., 2016; Yamaguchi i wsp., 2013). Wyciszenie ekspresji Spp1 w komórkach glejaka C6 hamowało wzrost glejaka u szczurów. Towarzyszyło temu zmniejszenie liczby GAMs charakteryzujących się fenotypem pronowotworowym. Wykazano także, że Spp1 stymulowała zależną od mikrogleju inwazyjność komórek nowotworowych, w czym pośredniczyły receptory integrynowe. O zaangażowaniu Spp1 w proces aktywacji mikrogleju świadczą wyniki doświadczeń z wykorzystaniem peptydu zawierającego motyw RGD i zaprojektowanego tak, by blokował oddziaływanie tego białka z integrynami $\alpha\beta 3$ oraz $\alpha\beta 5$. Dodanie peptydowego inhibitora znosiło aktywujące działanie na mikroglej białek wydzielanych przez komórki glejaka (GCM, ang. *glioma-conditioned medium*) (Ellert-Miklaszewska i in. 2016b).

Do zbieżnych wniosków prowadzą też wyniki badań innych grup. Wyciszenie ekspresji *SPP1* w komórkach ludzkiego glejaka U87 prowadziło do zahamowania wzrostu guza w modelu *in vivo* oraz hamowało zdolność do migracji i ruchliwości komórek *in vitro* (Friedmann-Morvinski i wsp., 2016; Lamour i wsp., 2010). Ponadto obniżenie poziomu Spp1 w komórkach mieloidalnych lub komórkach glejaka powodowało zmniejszenie liczby GAMs i podwyższoną aktywność efektorową komórek T naciekających glejaka (Wei i in. 2018). Wyniki te zgodne są z wynikami uzyskanymi w przypadku innych nowotworów takich jak: rak piersi (Chakraborty, Jain, i Kundu 2008), macicy (Du i in. 2009) oraz prostaty (Liu i wsp., 2010). Dane te wskazują, że wydzielana przez glejaka Spp1 stanowi ważny czynnik modyfikujący GAMs i mikrośrodkowisko, dlatego też stanowi dobry cel farmakologiczny.

4.3.4. Enzymy zaangażowane w metabolizm aminokwasów niezbędnych dla limfocytów T

Szczególnym mechanizmem hamowania odpowiedzi odpornościowej w guzie, mającym bezpośredni wpływ na proliferację i funkcjonowanie komórek T, jest wzmożona aktywność w mikrośrodku nowotworu dwóch enzymów: arginazy 1 (ARG1) i 2,3-dioksygenazy indoloaminowej (IDO, ang. *indoleamine-2,3-dioxygenase*). Enzymy te metabolizują odpowiednio: argininę do ornityny i mocznika, oraz tryptofan do N-formylokynureiny. Intensywny katabolizm argininy i tryptofanu powoduje gwałtowny spadek poziomu obu aminokwasów w środowisku i w efekcie, zahamowanie proliferacji i anergię komórek T. Wielu badaczy potwierdziło wysoką ekspresję IDO1 oraz ARG1 w GBM. Ponadto wyższy poziom ekspresji opisywanych enzymów jest odwrotnie proporcjonalny do przeżywalności pacjentów. Dlatego też regulacja mikrośrodowiska poprzez przeprogramowanie metabolizmu aminokwasów stała się obiektem zainteresowania naukowców (Sarantopoulos i wsp., 2024).

Istnieją dwie izoformy arginazy (ARG1 i ARG2), katalizujące tę samą reakcję biochemiczną, ale różniące się lokalizacją wewnątrzkomórkową oraz ekspresją. ARG1 jest białkiem cytozolowym, natomiast ARG2 jest zlokalizowana głównie w mitochondriach (Munder, 2006). Arginaza katalizuje hydrolizę L-argininy do mocznika i L-ornityny (Morris Jr, 2009). L-arginina bierze udział w licznych, kluczowych procesach w organizmie. Po pierwsze, uczestniczy w metabolizmie azotu w cyklu mocznikowym zachodzącym w wątrobie. Po drugie, jest potrzebna do syntezy kreatyniny, która zaopatruje tkanki o dużym zapotrzebowaniu na energię, takie jak mózg i mięśnie. Po trzecie, jest niezbędna do proliferacji limfocytów T i zainicjowania efektywnej odpowiedzi przeciwnowotworowej.

L-arginina jest dla limfocytów T aminokwasem egzogennym. Brak L-argininy w środowisku blokuje proliferację, produkcję cytokin i funkcje efektorowe limfocytów T. Niedobór tego aminokwasu prowadzi m. in. do obniżenia ekspresji łańcucha ζ , który stanowi kluczowy element kompleksu TCR (ang. *T cell receptor*) oraz bierze udział w przekazywaniu sygnału i aktywacji tych komórek. Ponadto, limfocyty T pozbawione L-argininy wytwarzają mniejsze ilości interferonu gamma (IFN- γ), który jest ważnym mediatorem odpowiedzi przeciwnowotworowej. Arginaza moduluje zatem aktywność limfocytów T poprzez wpływ na poziom L-argininy (Munder i wsp., 2013). Arginaza ulega silnej ekspresji w GAMs i MDSC w mikrośrodku nowotworu (Kumar i wsp.,

2016). Ponadto komórki Treg odznaczają się wysoką ekspresją ARG2 (Lowe i wsp., 2019). W ten sposób zmiany ekspresji ARG1 lub ARG2 w różnych komórkach odpornościowych w mikrośrodku nowotworu mogą przyczyniać się do wzrostu i progresji guza. W glejakach mysich oraz ludzkich, zwiększoną ekspresję arginazy wykrywa się zarówno w komórkach układu odpornościowego naciekających nowotwór, jak i samych komórkach nowotworowych (Gieryng i wsp., 2017; Zhang i wsp., 2016), co przyczynia się do wytworzenia immunosupresyjnego środowiska (Gabrilovich i wsp., 2012; Sippel i wsp., 2011). Ponadto analiza bioinformatyczna danych dotyczących ekspresji arginazy z Gene Expression Omnibus (GEO) oraz The Cancer Genome Atlas (TCGA) w GBM wykazała, że ekspresja *ARG1* jest zwiększona u pacjentów z GBM oraz jest negatywnym czynnikiem prognostycznym (Costa i wsp., 2016).

ARG1 oraz ARG2 stanowią zatem atrakcyjny cel terapeutyczny w leczeniu onkologicznym. Jedną ze strategii mającą na celu zablokowanie enzymu jest zastosowanie inhibitora ARG1/ARG2 u chorych z nowotworem. Zużycie zapasów L-argininy w mikrośrodku stanowi ważny mechanizm immunosupresji, a wysoką aktywność arginazy w osoczu i nowotworze wykazano u pacjentów z szerokim spektrum nowotworów, w tym również w glejaku złośliwym. Przykładem tak działającego inhibitora jest OAT-1746, opracowany przez firmę Molecure, m.in. w celu oceny jego działania na mikrośrodku nowotworu w glejakach.

4.4. Terapie celujące w komórki odpornościowe w mikrośrodku nowotworu

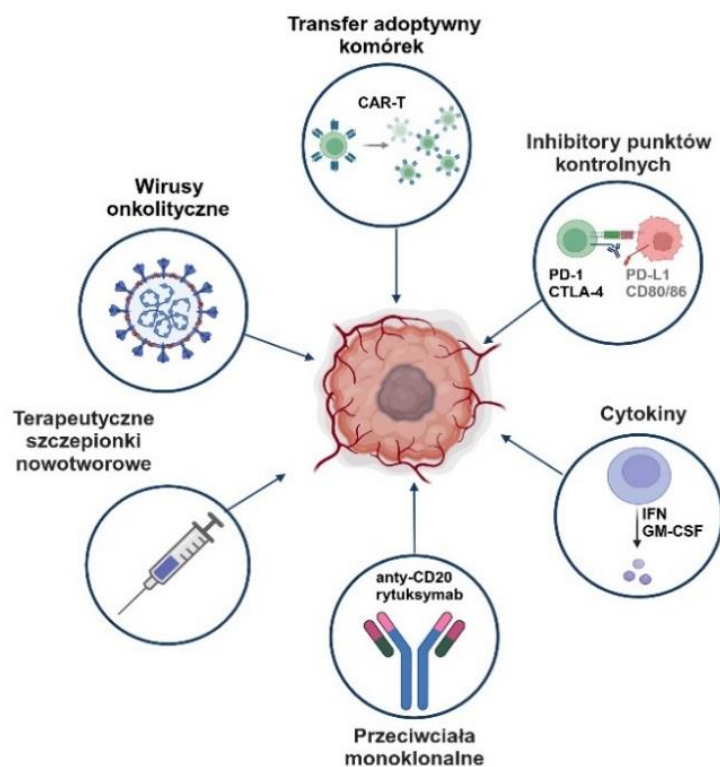
Rola mikrośrodku nowotworu w rozwoju i progresji guza, a także oporności na terapie przeciwnowotworowe, jest obecnie obiektem zainteresowania w badaniach nad wieloma typami nowotworów. Poznawanie mechanizmów funkcjonujących w mikrośrodku glejaków ma na celu stworzenie podstaw dla rozwoju nowych strategii terapeutycznych. Dla uzyskania lepszych efektów terapii próbuje się też opracowywać strategie oparte na łączeniu różnych metod leczenia.

4.4.1. Immunoterapia nowotworów

Immunoterapia nowotworów jest metodą leczenia polegającą na ingerencji w układ odpornościowy człowieka w celu zwiększenia lub modyfikacji mechanizmów obronnych przeciw rozwijającemu się nowotworowi. Amerykańskie Stowarzyszenie

Walki z Rakiem (ACS, American Cancer Society,) zdefiniowało immunoterapię jako metodę leczenia polegającą na wykorzystywaniu elementów układu immunologicznego chorego w celu zwalczania choroby (Rzepka i wsp., 2019).

Strategie immunoterapeutyczne, w zależności od ich zdolności do aktywacji układu odpornościowego pacjenta, można podzielić na bierne i czynne (Schemat 2). Immunoterapia bierna jest wykorzystywana wtedy, gdy układ odpornościowy pacjenta nie może wykształcić prawidłowej odpowiedzi odpornościowej, natomiast immunoterapię czynną stosuje się u pacjentów, których układ odpornościowy może pełnić funkcje efektorowe. Zgodnie z tą klasyfikacją, immunoterapia bierna obejmuje podawanie: cytokin, swoistych nowotworowo przeciwciał monoklonalnych, a także aktywowanych *ex vivo* komórek układu odpornościowego, głównie limfocytów T, pobranych wcześniej od pacjenta (tzw. transfer adoptywny komórek układu odpornościowego). Strategie polegające na podawaniu szczepionek przeciwnowotworowych oraz inhibitorów immunologicznych punktów kontrolnych wywołują efekt przeciwnowotworowy jedynie we współpracy z układem odpornościowym pacjenta, dlatego są zaliczane do immunoterapii czynnej (Mackiewicz i wsp., 2010; Papaioannou i wsp., 2016).



Schemat 2. Rodzaje immunoterapii w nowotworach.

4.4.1.1. Przykłady immunoterapii biernych

Zastosowanie cytokin, a konkretnie terapii rekombinowanym IFN α było pierwszym typem immunoterapii wprowadzonym do praktyki klinicznej. Trzy główne typy cytokin wykorzystywane obecnie w immunoterapii to interferony, interleukiny i czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów (GM-CSF). Cytokiny bezpośrednio stymulują wzrost i aktywność komórek odpornościowych (Pinheiro i wsp., 2023).

Transfer adoptywny komórek (ACT, ang. *adoptive cell transfer*) jest jedną z metod biernej immunoterapii stosowanej w zwalczaniu chorób nowotworowych i polega na transplantacji komórek układu odpornościowego o aktywności cytotoksycznej wobec komórek nowotworowych. Komórki pobiera się od pacjenta, następnie namnaża i aktywuje pozaustrojowo w obecności czynników wzrostu. Zaktywowane komórki przeszczepia się z powrotem pacjentowi. Podstawowa metoda ACT polega na wykorzystaniu limfocytów T pozyskanych z próbek guza, tzw. limfocytów naciekających guz (TILs, ang. *tumor-infiltrating lymphocytes*) (Liu i wsp., 2024). Zwiększenie skuteczności ACT jest możliwe dzięki zastosowaniu metod inżynierii genetycznej i uzyskaniu zmodyfikowanych limfocytów CAR-T, czyli limfocytów T zdolnych do ekspresji chimerycznych receptorów antygenowych (CARs, ang. *chimeric antigen receptors*). Najprostsze CARs są zbudowane z fragmentu wiążącego antygen nowotworowy, pochodzącego z przeciwciała oraz z domeny aktywującej, pochodzącej z kompleksu receptora limfocyty T (Golubovskaya i wsp., 2016). W ostatnim okresie pojawiły się pojedyncze doniesienia o sukcesie terapii z użyciem CAR-T w glejakach (Choi i wsp., 2024)

W immunoterapii biernej wykorzystuje się również działanie tzw. przeciwciał monoklonalnych skierowanych przeciwko receptorom powierzchniowym komórek nowotworowych. Pierwsze przeciwciała monoklonalne zastosowane w leczeniu przeciwnowotworowym to rytuksymab (przeciwciało anti-CD20), stosowany w leczeniu chłoniaków nieziarniczych i przewlekłej białaczki limfatycznej, oraz trastuzumab (przeciwciało anti-HER2, human epidermal receptor type 2), wykorzystywany w raku piersi. Podstawowe działanie przeciwciał polega na blokowaniu receptorów dla szlaków przewodzenia wewnątrzkomórkowego, co powoduje zahamowanie proliferacji i apoptozę komórek docelowych. Od wymienionych powyżej przeciwciał

monoklonalnych należy wyraźnie odróżnić przeciwciała oddziałujące na immunologiczne punkty kontrolne (opisane poniżej w punkcie 4.4.1.2) ze względu na zupełnie odmienny mechanizm działania oparty o zniesienie immunotolerancji (Malesa i wsp., 2018).

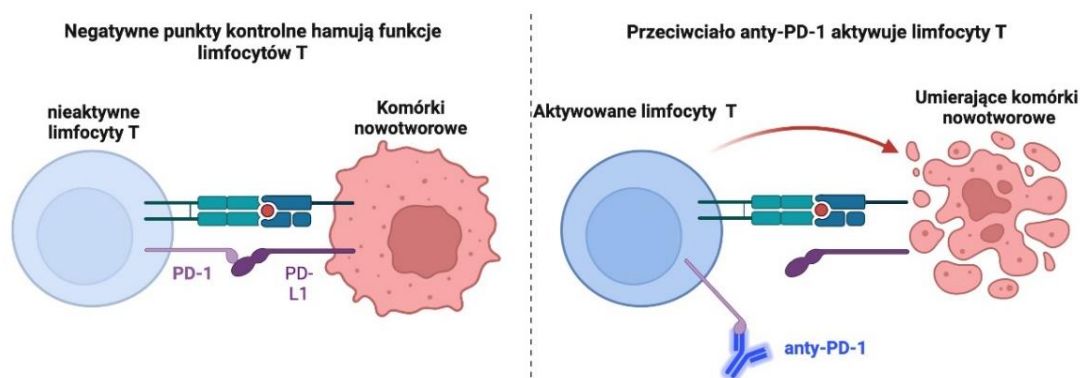
4.4.1.2. Immunologiczne punkty kontrolne i ich inhibitory

Układ odpornościowy do prawidłowego działania wymaga wytworzenia odpowiednich mechanizmów kontroli jego aktywności. Prawidłową równowagę pomiędzy sygnałami pobudzającymi i hamującymi odpowiedź immunologiczną zapewniają immunologiczne punkty kontrolne (Pianko i in. 2017). Limfocyty T do pobudzenia wymagają dwóch różnych sygnałów od komórek prezentujących antygen (APC, ang. *antigen presenting cells*). Pierwszym sygnałem jest rozpoznanie antygeny, prezentowanego w kontekście cząsteczek głównego układu zgodności tkankowej klasy II (MHC-II, ang. *major immunohistocompatibility complex, class II*) znajdującego się na APC, przez receptor TCR znajdujący się na limfocycie T. Drugim sygnałem jest kostymulacja, np. poprzez interakcję cząsteczki CD28 limfocytu T z cząsteczkami CD80 lub CD86 na APC. O losach limfocytu decydują ponadto cząsteczki koinhibujące, czyli immunologiczne punkty kontrolne, których rolą jest hamowanie nadmiernej odpowiedzi układu odpornościowego

Wśród hamujących immunologicznych punktów kontrolnych wyróżnić można: antygen 4 związany z limfocytem T cytotoksycznym (CTLA-4, ang. *cytotoxic T-lymphocyte antigen-4*), receptor programowanej śmierci 1 (PD-1, ang. *programmed death receptor-1*), LAG-3 (ang. *lymphocyte - activation gene 3*), TIM-3 (ang. *T-cell immunoglobulin and mucin domain 3*) (Pardoll, 2012). Natomiast TNFSF9 (tumor necrosis factor ligand superfamily member 9, znany również jak 4-1BB lub CD137) oraz TNFRSF18 (tumor necrosis factor receptor superfamily member 18, znany również jako GITR) są cząsteczkami aktywującymi.

W mikrośrodku nowotworu istnieje przewaga sygnałów hamujących funkcje limfocytów T, co doprowadza do anergii tych komórek i ucieczki komórek nowotworowych spod nadzoru układu odpornościowego. Ekspresję ligandów, które rozpoznają i wiążą się z białkami partnerskimi (receptorami) na powierzchni komórek T, wykazują zarówno komórki glejaka, jak i immunosupresyjne komórki mieloidalne. Jedną z koncepcji immunoterapii opiera się na blokowaniu immunologicznych punktów

kontrolnych z użyciem specyficznych przeciwciał w celu odwrócenia anergii limfocytów T (Schemat 3). Do najlepiej poznanych hamujących immunologicznych punktów kontrolnych, wobec których stosuje się leczenie z wykorzystaniem blokujących przeciwciał, należą: antygen 4 związany z limfocytym T cytotoksycznym oraz receptor programowanej śmierci 1 (Pardoll, 2012).



Schemat 3. Działanie receptora programowanej śmierci 1 (PD-1) jako jednego z immunologicznych punktów kontrolnych i jego blokowanie z użyciem przeciwciała anty-PD-1.

Ligandami receptora PD-1 są: PD-L1 (określany także jako B7-H1 lub CD274) i PD-L2 (określany także jako B7-DC lub CD273) (Riella i wsp., 2012). PD-1 ulega ekspresji na aktywowanych limfocytach T i B, komórkach NKT i monocytach (Keir i wsp., 2007). Aktywacja tych receptorów odbywa się po połączeniu z odpowiednimi ligandami zlokalizowanymi na komórkach nowotworowych lub innych komórkach obecnych w mikrośrodowisku guza. PD-L1 ulega stałej ekspresji na limfocytach, komórkach dendrytycznych i makrofagach. Podstawową rolą receptora PD-1 jest hamowanie funkcji limfocytów T na skutek związania jednego z ligandów na komórce APC, co prowadzi do spowolnienia metabolizmu komórki, tym samym pozbawiając limfocyty ich funkcji efektorowych (Riley, 2009). Wówczas dochodzi do zahamowania produkcji IFN- γ , IL-2 oraz TNF- α (Riella i wsp., 2012).

Ekspresję PD-L1 wykryto na komórkach wielu ludzkich nowotworów i w przypadku niektórych jest ona negatywnym czynnikiem prognostycznym przeżywalności pacjentów. PD-L1 ulega indukcji w odpowiedzi na zmiany zachodzące w mikrośrodowisku guza. Komórki nowotworowe bronią się przed atakiem limfocytów poprzez ekspresję PD-L1, który następnie hamuje działanie limfocytów. Obecność

limfocytów naciekających nowotwór może świadczyć o immunogenności danego nowotworu, co jest dobrym czynnikiem prognostycznym. Jednak wiążąca się z obecnością limfocytów naciekających nowotwór ekspresja PD-L1 znacząco obniża skuteczność ich działania. Dlatego też blokada receptora może przyczynić się do podniesienia skuteczności odpowiedzi przeciwnowotworowej (Taube i wsp., 2012).

Przeciwciała monoklonalne skierowane przeciwko PD-1 (np. niwolumab) i jego ligandowi PD-L1 stosuje się z sukcesem u pacjentów z czerniakiem, niedrobnokomórkowym rakiem płuca, rakiem płaskonabłonkowym głowy i szyi, rakiem wątroby oraz rakiem urotelialnym. Pierwsze randomizowane badanie III fazy CheckMate 143 (NCT02017717) z zastosowaniem niwolumabu u pacjentów z GBM po wznowie nie przedłużyło przeżycia w porównaniu z bewacyzumabem (przeciwciało anti-VEGF), co doprowadziło do zamknięcia badania. Skuteczność terapii była ograniczona - mniej niż 15% pacjentów wykazało istotną poprawę. W kolejnym badaniu CheckMate 498, 560 pacjentów z nowozdiagnozowanym GBM otrzymało radioterapię w skojarzeniu z niwolumabem lub TMZ. Jednakże również w tym badaniu nie wykazano wystarczającej skuteczności immunoterapii (Ghosh i wsp., 2022).

Przeprowadzono również szereg badań z wykorzystaniem inhibitorów innych punktów kontrolnych w celu sprawdzenia ich aktywności w glejakach. Jednym z nich było przeciwciało przeciwko CTLA-4, białku transbłonowemu, które hamuje funkcję limfocytów T poprzez konkutowanie z CD28 o ligandy CD80 i CD86 na komórkach APC. CTLA-4 jest kluczowym czynnikiem supresyjnym limfocytów T $CD4^+CD25^+FoxP3^+$, a jego blokada zwiększa aktywację limfocytów T (Wang i wsp., 2024). Obecnie trwa badanie kliniczne II fazy NCT04396860, oceniające skuteczność skojarzenia ipilimumabu i niwolumabu w porównaniu z TMZ u pacjentów z nowo zdiagnozowanym GBM.

Kolejnym punktem kontrolnym wykorzystanym jako cel terapeutyczny był TIM-3, który ulega ekspresji na limfocytach Th1 produkujących IFN- γ . Jego ligand, galektyna-9, indukuje apoptozę Th1, co ogranicza odpowiedź immunologiczną. Blokada TIM-3 zwiększała produkcję IFN- γ , wspomagając odpowiedź przeciwnowotworową (Ngiow i wsp., 2011). W mysim modelu GBM terapia potrójna (radioterapia, anti-PD-1 i anti-TIM-3) prowadziła do całkowitej eliminacji guza (Kim i wsp., 2017). Ponadto sprawdzono LAG-3 (CD223), receptor hamujący, którego głównym ligandem jest MHC klasy II. Blokada LAG-3 prowadziła do proliferacji cytotoksycznych limfocytów T i

ograniczała funkcję Tregs. W mysim modelu glejaka wykazano, że połączenie przeciwciał anti-LAG-3 z anti-PD-1 znacząco zmniejszało wielkość guza i wydłużało przeżycie myszy (Harris-Bookman i wsp., 2018). Potrzeba czasu, aby zweryfikować te obiecujące wyniki badań przedklinicznych w praktyce klinicznej. W Tabeli 1 zestawiono inhibitory immunologicznych punktów kontrolnych stosowane w badaniach klinicznych u pacjentów z GBM. Jak dotąd najwięcej badań obejmowało użycie przeciwciał przeciwko PD-1 lub jego ligandom, dlatego blokowanie tego immunologicznego punktu kontrolnego zostało wybrane jako model immunoterapii w niniejszej pracy.

Tabela 1. Inhibitory immunologicznych punktów kontrolnych stosowane w badaniach klinicznych u pacjentów z glejakiem

<i>Cząsteczka</i>	<i>Nazwa preparatu</i>
PD-L1	Avelumab
	Atezolizumab
	Durvalumab
CTLA-4	Ipilimumab
PD-1	Nivolumab
	Pidilizumab
	Pembrolizumab
LAG-3	BMS-986016
	Relatlimab
TIM-3	Sabatolimab
TIGIT	Domvanalimab

4.4.2. Blokowanie napływu i przeprogramowania komórek mieloidalnych w glejakach

Unikalny skład mikrośrodowiska złośliwych glejaków jest jednym z głównych powodów ograniczonej skuteczności immunoterapii z użyciem inhibitorów punktów kontrolnych. Nowatorskie strategie do modulowania mikrośrodowiska nowotworu obejmują różnego rodzaju terapie celowane w komórki mieloidalne. Inhibitory CSF-1R (receptora czynnika stymulującego tworzenie kolonii (CSF)-1 (Pyonteck i wsp., 2013) lub blokadę osi CCR2/CCL2 (Flores-Toro i wsp., 2020) stosowano w badaniach przedklinicznych w celu przekształcenia tzw. zimnego (ang. "cold") mikrośrodowiska

nowotworu związanego z przewagą immunosupresyjnych komórek oraz niedoborem cytotoksycznych limfocytów T do gorącego (ang. „hot”), charakteryzującego się zwiększoną liczbą limfocytów T oraz spadkiem napływu komórek immunosupresyjnych, co może również przyczyniać się do poprawy odpowiedzi na inhibitory punktów kontrolnych, a potencjalnie także na inne immunoterapie (Y. Liu i in. 2024).

Wiązanie cząsteczek adhezyjnych, chemokin, czynników wzrostu czy białek macierzy zewnątrzkomórkowej do specyficznych receptorów tworzy sieć komunikacji między nowotworem i mikrośrodowiskiem. Większość białek oddziałuje ze swoimi partnerami białkowymi poprzez rozległe i płaskie powierzchnie, na które mogą działać wyłącznie leki tzw. „leki biologiczne”, innymi słowy, białka, przeciwciała monoklonalne i krótkie peptydy. Najbardziej specyficznym sposobem interferencji w oddziaływanie białko-białko z potencjałem wykorzystania w praktyce klinicznej jest zastosowanie krótkich peptydów (Ellert-Miklaszewska i wsp., 2017a). Właściwie zaprojektowane krótkie peptydy interferujące wykazują wysoką specyficzność wiązania z białkiem docelowym i mają zmniejszoną immunogenność. Ponadto są łatwe w syntezie oraz stosunkowo prosto można poddawać je różnym modyfikacjom, które mogą zwiększać stabilność proteolityczną cząsteczek i chronić przed degradacją. Blokowanie interakcji ligand – receptor przy użyciu peptydów to znana strategia terapeutyczna (Vadevoo i wsp., 2023). Przykładem peptydu blokującego interakcję ligand-receptor jest peptyd A8, który zapobiega interakcji pomiędzy białkiem szoku cieplnego Hsp72 i receptorem toll-podobnym 2 (TLR2) na powierzchni mieloidalnych komórek supresorowych. Blokuje to aktywację tych komórek hamując progresję nowotworu i wzmacniając przeciwnowotworowe działanie środków chemioterapeutycznych, takich jak cisplatyna (Gobbo i wsp., 2016).

Jednym z badanych celów terapeutycznych w nowotworach (w tym w GBM) są integryny. Jest to duża rodzina transbłonowych receptorów adhezyjnych tworzących heterodimery (Xiong i wsp., 2013). Cząsteczki te są zaangażowane w komunikację komórka-komórka i komórka-mikrośrodowisko. Po związaniu z ligandami, integryny aktywują dalsze szlaki sygnałowe, które regulują migrację, inwazję i proliferację. Geny kodujące integryny rzadko ulegają mutacji w nowotworach, jednak rozregulowana sygnalizacja integryn może wystąpić albo z powodu zmian w ekspresji integryn, albo nieprawidłowych zmian w ekspresji ich ligandów. W guzach mózgu stwierdzono podwyższoną ekspresję integryn $\alpha\beta3$ i $\alpha\beta5$ (Bello i wsp., 2001). Podstawowy motyw

wiążący te integryny, złożony z argininy, glicyny i kwasu asparaginowego (RGD), przyciągnął wiele uwagi w dziedzinie terapii przeciwnowotworowych. Należy tu wspomnieć o pierwszym z peptydów z motywem RGD, który zidentyfikowano jako selektywny inhibitor integryn $\alpha\beta3$ i $\alpha\beta5$. Jest to cykliczny pentapeptyd o nazwie Cilengitide (EMD 121974, cyklo-(Arg-Gly-Asp-DPhe-NMe-Val), MerckKGaA, Darmstadt, Germany). W badaniach przedklinicznych stwierdzono, że cilengitid ma działanie cytotoksyczne i hamujące inwazyjność (Yamada i wsp., 2006), jednak w badaniach klinicznych stosowano go jako lek anty-angiogeny. W badaniu klinicznym fazy I/IIa przeprowadzonym na 52 pacjentach z GBM, dodanie cilengitidu do chemio- i radioterapii wykazało działanie przeciwnowotworowe (Stupp i wsp., 2010). Peptyd ten został wprowadzony do III fazy badań klinicznych u pacjentów z GBM (Weller i wsp., 2016), jednakże ostatecznie jego skuteczność w tej fazie badań nie była wystarczająca i nie uzyskano pozytywnych efektów na przeżywalność pacjentów.

Co ciekawe, badania prowadzone w Pracowni Neurobiologii Molekularnej wykazały, że integryny mogą również odgrywać rolę w przeprogramowaniu mikrogleju w komórki wspierające rozwój glejaków pośrednicząc w działaniu Spp1 i laktadheryny. Zaprojektowany w Pracowni krótki peptyd 7aaRGD (kompetycyjny inhibitor integryn, zawierający motyw RGD, zwany w skrócie RGD) blokował oddziaływanie glejak-mikroglej w hodowli *in vitro* (Ellert-Miklaszewska i wsp., 2016b). Periostyna, inne białko wydzielane przez glejaka w mysim modelu tego nowotworu, indukowało napływ komórek mieloidalnych do guza za pośrednictwem integryny $\alpha\beta3$. Hamowanie działania periostyny na ten receptor przez inny peptyd zawierający motyw RGD prowadziło do ograniczenia wzrostu guza (Zhou i wsp., 2015).

Innym podejściem terapeutycznym, ukierunkowanym na komórki MDSC w mikrośrodowisku glejaka, jest użycie cyklicznego peptydu VT1021 wywodzącego się z prosapozyny. Częsteczka ta, której działanie opisano pierwotnie w modelu raka jajnika, zwiększa ekspresję trombospondyny-1 (TSP-1) w komórkach MDSC, przez co prowadzi do zwiększenia odsetka makrofagów o fenotypie przeciwnowotworowym oraz przeprogramowania mikrośrodowiska w różnych typach guzów litych, w tym w glejakach (Wang i wsp., 2016).

5. CEL PRACY

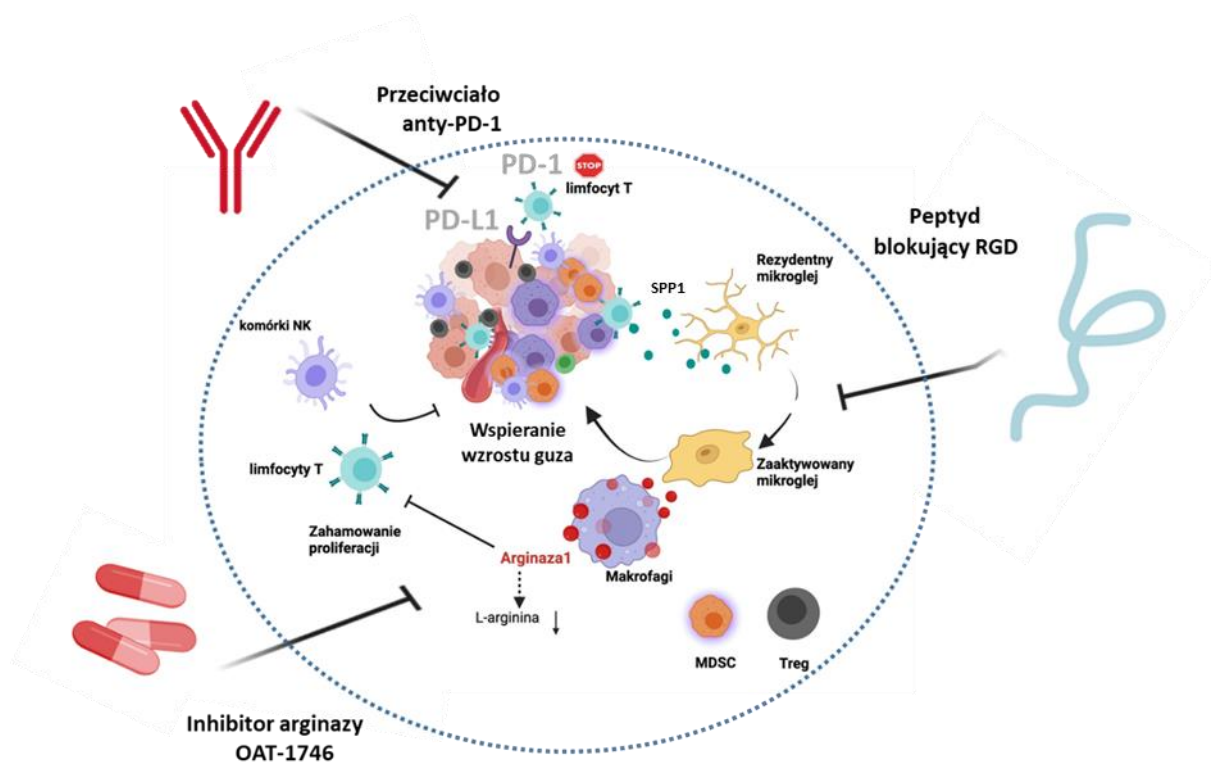
Szereg mechanizmów wynikających z interakcji komórek nowotworowych z innymi komórkami gromadzącymi się w guzie przyczynia się do znacznych zmian w mikrośrodowisku, blokując m.in. odpowiedź na immunoterapie. W ludzkich i mysich glejakach złośliwych, zarówno komórki nowotworowe, jak i komórki mieloidalne związane z guzem GAMs, wykazują podwyższoną ekspresję arginazy, co hamuje aktywność cytotoksycznych limfocytów T i komórek NK, i prowadzi do tworzenia immunosupresyjnego mikrośrodowiska. Badania przeprowadzone w Pracowni Neurobiologii Molekularnej IBD PAN wykazały, że produkowany przez komórki glejaka ligand receptorów integrynowych $\alpha V\beta 3/\beta 5$ – białko Spp1, indukuje przeprogramowanie komórek mieloidalnych w GAMs. Zarówno arginaza, jak i Spp1 są zatem dobrymi celami terapeutycznymi dla zablokowania zmian w mikrośrodowisku glejaków.

Celem niniejszej pracy była ocena przeciwnowotworowego działania inhibitora arginazy (OAT-1746) oraz peptydu interferującego RGD, a także ich wpływu na mikrośrodowisko i odpowiedź na immunoterapię w mysim glejaku GL261.

Szczegółowe cele badawcze:

1. Ocena wpływu inhibitora arginazy oraz przeciwciała anti-PD-1 na wzrost glejaka.
2. Analiza wpływu inhibitora arginazy oraz przeciwciała anti-PD-1 na mikrośrodowisko nowotworu.
3. Ocena zmian transkryptomicznych w komórkach mieloidalnych z glejaków po zastosowaniu OAT-1746 i anti-PD-1.
4. Ocena wpływu peptydu RGD na wzrost glejaka.
5. Analiza wpływu peptydu RGD oraz przeciwciała anti-PD-1 na mikrośrodowisko nowotworu.
6. Ocena zmian transkryptomicznych w komórkach mieloidalnych z glejaków po zastosowaniu peptydu RGD oraz przeciwciała anti-PD-1.

Przedstawione cele posłużą do zrozumienia mechanizmów działania innowacyjnych terapii w leczeniu glejaków, co może przyczynić się do opracowania bardziej efektywnych strategii terapeutycznych.



Schemat 4. Zaproponowane strategie celujące w komórki mieloidalne w mikrośrodowisku nowotworu.

6. MATERIAŁY I METODY

6.1. Komórki mysiego glejaka GL261

6.1.1. Charakterystyka komórek GL261

Komórki mysiego glejaka GL261 są powszechnie stosowane w badaniach przedklinicznych nad glejakiem. Komórki te otrzymano z komórek guza mózgu (wyindukowanego w wyniku domózgowych iniekcji 3-metylocholanem), które po izolacji poddawano wielokrotnej domózgowej i podskórnej transplantacji do syngenicznego szczepu myszy (Szatmári i wsp., 2006). Guzy rozwijające się w następstwie implantacji komórek GL261 mają wiele wspólnych cech histologicznych z ludzkim GBM, takich jak np.: martwica nowotworu czy neowaskularyzacja, a także odzwierciedlają immunosupresyjne mikrośrodowisko glejaka (Abdelwahab i wsp., 2011; Oh i wsp., 2014). Ponadto genetycznie modyfikowane komórki GL261 wykazujące ekspresję genu lucyferazy są powszechnie stosowane do implantacji wewnątrzczaszkowych ze względu na możliwość obrazowania bioluminescencyjnego guza *in vivo*, co pozwala monitorować jego wzrost oraz reakcję na leczenie (Shelton i wsp., 2010). Biorąc pod uwagę łatwą i stabilną hodowlę *in vitro*, komórki GL261 stanowią dogodny model do badania mechanizmów molekularnych wpływających na progresję GBM oraz badań nad nowymi strategiami ograniczania wzrostu z glejaka.

6.1.2. Hodowla komórek i stosowane warunki doświadczalne

Komórki glejaka mysiego GL261 otrzymano od prof. Helmuta Kettenmana (MDC, Berlin, Niemcy). Z komórek GL261 w wyniku stabilnej transfekcji plazmidem kodującym białko czerwonej fluorescencji tdTomato oraz enzym lucyferazę (luc) otrzymano komórki glejaka GL261 tdTomato+luc⁺ (GL261 tdT⁺luc⁺), jak opisano w pracy (Ochocka i wsp., 2021). Komórki GL261 oraz GL261 tdT⁺luc⁺ hodowano w pożywce DMEM (ang. Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Gibco) wzbogaconej 10% surowicą bydlęcą (ang. FBS, *fetal bovine serum*, Gibco). Po rozmrożeniu komórki GL261 tdT⁺luc⁺ hodowano w pożywce z dodatkiem 400 µg/ml G418 (Roche, Mannheim, Niemcy) przez dwa pasaży. Hodowle prowadzono w sterylnych jednorazowych plastikowych butelkach przeznaczonych do hodowli komórkowych. Do momentu rozpoczęcia doświadczenia komórki pasażowano co 2-4 dni w zależności od ich

aktywności proliferacyjnej. Przy pasażowaniu komórek stosowano 0,25% roztwór trypsyny z 0,02% EDTA (kwas edetynowy, Sigma). Bank komórek przechowywano w temperaturze -80°C (do bieżącego użytku) oraz w ciekłym azocie w temperaturze -193°C (w celu dłuższego przechowywania) w roztworze krioprotekcyjnym o składzie: 90% surowica FBS i 10% DMSO (dimetylosulfotlenek, Sigma).

6.2. Model glejaka *in vivo*

6.2.1. Model zwierzęcy

Obiektem badawczym w opisanych doświadczeniach był samiec myszy domowej (szcep C57BL/6J w wieku 8-12 tygodni) o wadze 20-25 g. Zwierzęta pochodziły z hodowli prowadzonej w zwierzętarni Instytutu Biologii Doświadczalnej lub były sprowadzane z Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku. Doświadczenia przeprowadzono zgodnie z zasadami sztuki medycyny weterynaryjnej i etyki eksperymentatora. Poszczególne etapy doświadczeń przeprowadzano ściśle według procedur zaakceptowanych przez Lokalną Komisję Etyczną Nr1 w Warszawie (562/2018; 812/2019; 1049/2020). Zwierzęta przebywały w zwierzętarni, w klatkach IVC – linia Green Line IVC Model GM 500, powierzchnia podłogi w klatce: 501cm², producent: Tecniplast. Klatki były wyposażone w ściółkę z celulozy oraz elementy wzbogacenia środowiska: materiał na gniazda z wiórów sosnowych oraz drewniane gryzaki. Liczba zwierząt w jednej klatce: 5 sztuk, zwierzęta miały stały dostęp do wody i paszy (przed i w trakcie eksperymentu). Myszy były utrzymywane w cyklu dobowym: 12/12 (światło od 9.00 do 21.00), temperatura pomieszczenia: 21-23 °C, wilgotność: 50-60%, liczba wymian powietrza na godzinę: 10-15.

6.2.2. Implantacja komórek glejaka do mózgu myszy

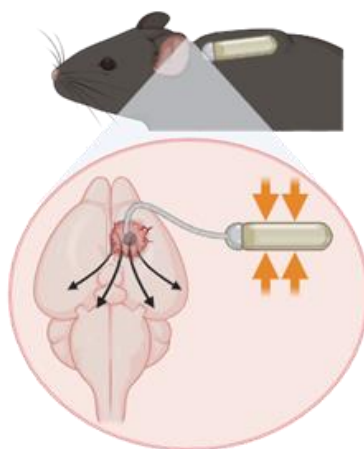
Do implantacji komórek GL261 tdT⁺ luc⁺ przygotowywano zawiesinę 80 tys. komórek w 1 µl DMEM. Komórki liczono przy użyciu komory Burkera i mikroskopu świetlnego. Komórki do momentu implantacji przechowywano na lodzie, nie dłużej jednak niż przez 3 godz. Operacje wykonywano w sterylnych warunkach z wykorzystaniem wysterylizowanych narzędzi. Myszy C57BL/6J – samce usypiano przy użyciu mieszaniny izofluranu (3-4% we wdychanym powietrzu) przez około 3 b w komorze do wprowadzania w narkozę. Po uzyskaniu znieczulenia ogólnego zwierzę

ważono. Następnie igłą o średnicy 0,33 mm podano podskórnio opioidowy środek przeciwbólowy (Butomidor, 2 mg/kg) oraz niesteroidowy lek przeciwzapalny i przeciwbólowy (Meloksykam, 10 mg/kg). Zwierzę unieruchomiono w aparacie stereotaktycznym i utrzymywano w uśpieniu wziewnym za pomocą mieszaniny Izofluranu (1%) z tlenem przez cały czas trwania operacji. Następnie gołono skórę na głowie zwierzęcia oraz podawano znieczulenie miejscowe (Bupiwakaina, 0,5%) podskórnio w miejscu cięcia. Na oczy наносzono preparat zapobiegający wysychaniu (Vidisic żel) oraz gaziki ochraniające przed intensywnym oświetleniem pola operacyjnego. Po potwierdzeniu głębokości znieczulenia (brak odruchów po ucisku opuszki palcowej oraz odruchu okostnowego po ściśnięciu kości śródstopia) na powierzchni czaszki wykonano cięcie skóry długości ok. 0,5 cm. Z atlasu stereotaktycznego (Paxinos i Franklin 2001) wybrano koordynaty prążkowania: AP (anterior/posterior) = + 1,0 mm; L (lateral) = - 2 mm; DV (dorsal/ventral) = - 3 mm w stosunku do punktu Bregmy. Po ustaleniu miejsca implantacji komórek glejaka, w czaszce nawiercono otwór o średnicy ok 1 mm, umożliwiając wprowadzenie igły o średnicy 0,46 mm. Igłę wprowadzono do mózgu na głębokość 3 mm, po czym podano zawiesinę komórek glejaka (8×10^4 komórek) w pożywce DMEM w całkowitej objętości 1 μ l, z szybkością 0,25 μ L/min, bezpośrednio do prawego prążkowania mózgu myszy. Po implantacji igłę wyciągano z prędkością 1 mm/min, aby zapobiec zassaniu komórek przy ruchu wstecznym. Ranę ciętą skóry zaszywano używając nici niewchłaniających (Mersilk) i igły o średnicy 0,15 mm. Podczas całej czynności zwierzę przebywało na macie grzewczej utrzymującej stałą, fizjologiczną temperaturę ciała. Przez cały okres trwania eksperymentu kontrolowano stan zdrowia zwierząt w celu wykrycia wszelkich oznak dystresu lub cierpienia. W przypadku wystąpienia takich objawów zwierzę zostało wyeliminowane z dalszych czynności oraz poddane humanitarnemu uśmierceniu.

6.2.3. Implantacja pomp osmotycznych dozujących badany peptyd do mózgu myszy

Pompy osmotyczne były przygotowywane (ang. '*priming*') na dzień przed planowaną implantacją. Do opisywanych doświadczeń używano następujących pomp firmy Alzet: model 2004: nr. kat.: 000298; objętość 200 μ l, wymiary 3 cm x 0,7 cm, tempo infuzji 0,25 μ l/godz., maksymalny czas infuzji 28 dni; waga 1,1 g (Schemat 5). Pompy wypełniano badanym peptydem lub roztworem kontrolnym (woda) w sterylnych warunkach, a następnie umieszczano w roztworze soli fizjologicznej w temperaturze

37°C na okres 18 godz. bezpośrednio przed implantacją. Do doświadczeń z użyciem obrazowania rezonansem magnetycznym stosowano zamienniki standardowych kaniuli do pomp (wykonane z materiałów niemagnetyzujących, bezpiecznych podczas obrazowania przyżyciowego). Kaniule te pozyskiwano komercyjnie z firmy Bilaney Consultations GMBH, nr. kat.: 328OPM/PK/SPC, nazwa produktu z ang. “*peak tubing mouse connector 3 mm G*”). Procedura implantacji komórek była identyczna jak opisano powyżej. Po implantacji komórek i powolnym wycofaniu igły, nacięcie skóry przedłużano w kierunku doogonowym do okolicy karku. W okolicy karku w przestrzeni podskórnej wykonywano „kieszę” (po odpreparowaniu tkanki podskórnej tej okolicy), w której umieszczana była pompa osmotyczna. Pompa osmotyczna była połączona cewnikiem polietylenowym z kaniulą, której koniec umieszczany był w miejscu otworu po implantacji komórek glejaka. Implantowana pompa na zasadzie wyrównywania ciśnienia osmotycznego dozowała badaną substancję w niej zawartą w sposób stały, z ustalonym natężeniem przepływu. Następnie rana cięta skóry była zszywana przy użyciu nici niewchłaniających (Mersilk) i igły o średnicy 0,15 mm. Podczas całej procedury zwierzę przebywało na macie grzewczej utrzymującej stałą, fizjologiczną temperaturę ciała, a po zakończeniu implantacji przebywało pod obserwacją do momentu pełnego wybudzenia z narkozy. Przez trzy dni po operacji, zwierzęta otrzymywały środek przeciwbólowy Meloksykam w dawce 2 mg/kg. Przez cały okres trwania doświadczenia codziennie kontrolowany był stan zdrowia zwierząt oraz ich masa ciała, w celu wykrycia wszelkich oznak dystresu.



Schemat 5. Implantacja pomp osmotycznych ALZET 2004.

6.2.4. Podawane substancje terapeutyczne

Zwierzęta z zaimplantowanym glejakiem były losowo przydzielane do grup doświadczalnych. Inhibitor arginazy OAT-1746 (dostarczony przez firmę OncoArendi) podawano dożołądkowo (50 mg/kg) dwa razy dziennie, począwszy od pierwszego dnia implantacji. Przeciwciało anty-PD-1 (BioLegend, GoInVivo™ Purified anti-mouse CD279) oraz kontrolę izotypową (IgG) podawano w postaci iniekcji dootrzewnowych (10 mg/kg) w 8, 10, 12 oraz 14 dniu po implantacji. Peptydy (peptyd RGD i peptyd kontrolny RAE) syntetyzowane były w firmie GeneScript. W celu zwiększenia ich stabilności peptydy były modyfikowane poprzez acetylację na końcu C i amidację na końcu N. Peptydy podawane były zwierzętom doguzowo, w sposób ciągły w postaci wodnego roztworu (o stężeniu 2 mg/ml) za pomocą pomp osmotycznych, które umieszczano pod skórą myszy bezpośrednio po implantacji komórek glejaka (jak opisano powyżej).

6.2.5. Przyżyciowe obrazowanie bioluminescencyjne guzów tworzonych przez komórki GL261 tdT⁺luc⁺ u myszy przy użyciu urządzenia Xtreme

Zwierzęta nastrzyknięto dootrzewnowo substratem do wizualizacji guza (sól potasowa D-lucyferyny), rozpuszczonym w zbuforowanym roztworze soli fizjologicznej (PBS) bez jonów Mg²⁺ i Ca²⁺ według protokołu 10 µl/g masy ciała. Po upływie 8 min od podania substratu, zwierzęta poddano znieczuleniu ogólnemu przy użyciu mieszaniny 2% Izofluranu i tlenu przez 2 min. Następnie zwierzę ułożono w komorze aparatu Xtreme, na gałkę oczną naniesiono żel przeciwdziałający wysychaniu (Vidisc żel). Po 10 min od wstrzyknięcia substratu rozpoczęto zbieranie sygnału. Parametry obrazowania ustalono następująco: czas ekspozycji 1 min; BIN (ang. 'binning') 1x1; wysoka czułość; FOV 7,2, fstop 1,1. Po przeprowadzeniu obrazowania bioluminescencyjnego wykonano zdjęcie radiograficzne zwierzęcia i nanoszono obraz bioluminescencji na zarys czaszki myszy. Przyżyciową wizualizację wzrostu guza przeprowadzono w 14, 21 i 28 dniu, licząc od dnia operacji. Objętość guzów wyznaczano przy użyciu dedykowanego oprogramowania Bruker Molecular Imaging (MI) na podstawie intensywności sygnału bioluminescencji, określanego w jednostkach foton/s/mm². Obszar zbierania sygnału (ROI, ang. *region of interest*) obejmował całą głowę zwierzęcia i był zastosowany taki sam do wszystkich obrazów w obrębie doświadczenia.

6.2.6. Przyżyciowe monitorowanie wzrostu guza metodą obrazowania rezonansu magnetycznego

Do pomiaru wielkości guzów w doświadczeniach z użyciem pomp osmotycznych dozujących peptydy wykorzystywano obrazowanie metodą rezonansu magnetycznego (MRI). Badania wykonano w Laboratorium Rezonansu Magnetycznego Małych Zwierząt (LRM) Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN (imdik.pan.pl). Laboratorium jest wyposażone w tomograf rezonansu magnetycznego przeznaczony do zastosowań badawczych (Biospec 70/30 USR, Bruker Biospin, Ettlingen, Niemcy). Aparatura wyposażona jest w konsolę Avance III z systemem B-GA 20S (amplituda 200 mT/m). Myszy obrazowane były przy użyciu kombinacji cewki transmitującej cylindrycznej (Bruker, wewnętrzna średnica 8,6 cm) oraz cewki odbiorczej dedykowanej dla myszy (Bruker, 2x2). Zwierzęta były transportowane z Instytutu Nenckiego w klatkach IVC linia Green Line IVC Model GM 500. Przed rozpoczęciem obrazowania zwierzę wprowadzano w znieczulenie ogólne (izofluran 3,5-4% w tlenie – indukcja, 1,5-2% podtrzymanie anestezji). Następnie zwierzę umieszczono na podgrzewanym stoliku/łożeczku i umieszczono w skanerze MRI. W trakcie badania zwierzę utrzymywano w narkozie na stabilnym poziomie dzięki wziewnemu systemowi podawania izofluranu. Podczas badania rezonansowego monitorowano parametry fizjologiczne zwierzęcia, w szczególności częstość oddechów i temperaturę ciała. Czas trwania pojedynczej sesji obrazowania nie przekraczał 1 godz. – czas badania skracano, jeśli dane zebrane w krótszym czasie umożliwiały otrzymanie wiarygodnych wyników. Obrazowano w sekwencji T2 zależnej przy użyciu cewki cylindrycznej nadawczo-odbiorczej o wymiarach 8,6 cm. Wszystkie sesje obrazowania rozpoczynały się od protokołu lokalizatora składającego się z trzech ortogonalnych skanów w celu dokładnego umieszczenia zwierzęcia w środku magnesu. W celu oceny objętości struktur mózgowych uzyskano strukturalne poprzeczne obrazy obejmujące cały mózg za pomocą T2 zależnej TurboRARE ($TR/TE_{eff} = 7000/30$ ms, współczynnik RARE = 4, rozdzielczość przestrzenna = $86\text{ }\mu\text{m} \times 86\text{ }\mu\text{m} \times 350\text{ }\mu\text{m}$, 42 warstwy, bez przerwy, liczba średnich (NA) = 4, czas skanowania ~ 23 min). Zwierzęta po obrazowaniu wybudzono pod nadzorem weterynaryjnym, następnie przetransportowywano z powrotem do Instytutu Nenckiego. Objętość guzów wyznaczano na podstawie analizy skanów w sekwencji T2 zależnej przy użyciu oprogramowania Osirix (Pixmeo, Geneve, Switzerland).

6.2.7. Postępowanie w końcowym punkcie doświadczenia - uśmiercenie i dysekcja mózgu w celu preparatyki materiału

Po upływie 14, 21 lub 28 dni od implantacji, zależnie od rodzaju doświadczenia, zwierzęta wprowadzano w narkozę przy użyciu Izofluranu (4% w tlenie/3 min) w komorze do usypiania zwierząt, a następnie narkozę pogłębiano przy użyciu Ketaminy (75 mg/kg dootrzewnowo) i Ksylazyny (1 mg/kg dootrzewnowo). Po zaniku objawów głębokiego czucia otwierano klatkę piersiową w celu odsłonięcia serca. Następnie wprowadzano igłę do perfuzji przez lewą komorę serca do aorty wstępującej, jednocześnie nacinając prawy przedsionek serca w celu odbarczania serca w czasie perfuzji. Perfuzja prowadzona była z wykorzystaniem pompy perystaltycznej, w sposób typowy, początkowo zbuforowanym zimnym roztworem soli (2-3 min 50 ml 0,1 M PBS -pH =7,4 schłodzonym do temperatury 4°C, do doświadczeń z wykorzystaniem cytometrii przepływowej, sortowania komórek oraz RNAseq), a następnie z zastosowaniem roztworu paraformaldehydu (50 ml schłodzonego 4% PFA rozpuszczonego w 0,1 M PBS - pH = 7,4, do doświadczeń z wykorzystaniem barwień immunofluorescencyjnych oraz analizy histologicznej guzów). Po perfuzji wykonywano dysekcję mózgu. Mózgi przeznaczone do barwień utrwalano przez 24 godz. w 4% PFA w 4°C, następnie umieszczano w 30% roztworze sacharozy rozpuszczonej w 0,1 M PBS w 4°C w celu zabezpieczenia przed pękaniem w trakcie zamrażania i utrzymywano do momentu, gdy opadły na dno falkonu, a następnie zamrażano na suchym lodzie i przechowywano w temperaturze -80°C. Mózgi przeznaczone do analizy cytometrycznej i RNA-seq lub oznaczania cytokin umieszczano w zimnym roztworze HBSS (Gibco) i poddawano, odpowiednio, dysocjacji do uzyskania jednorodnej zawiesiny komórek lub homogenizacji.

6.2.8. Wyznaczanie objętości guzów na podstawie histologicznej oceny skrawków mózgu

Do oceny wielkości guzów skrawki mózgu o grubości 12 µm nakładano na polilizynowane szkiełka podstawowe (Thermo Scientific), suszono, odwadniano i zamykano w balsamie zapobiegającym wygaszaniu fluorescencji. Ponieważ implantowane komórki glejaka GL261 tdT⁺ luc⁺ cechowały się stałą ekspresją białka fluorescencyjnego tdTomato, dodatkowe barwienie preparatów nie było potrzebne. Zdjęcia preparatów wykonywano w mikroskopie Leica DM4000 B, następnie przy

użyciu oprogramowania mikroskopu obrysowywano powierzchnię przekroju guzów i wyliczano ich pole powierzchni. Na szkiełka do wyliczenia objętości guzów zbierano co piąty skrawek, dlatego odległość między kolejnymi skrawkami o znanym polu powierzchni guza wynosiła 60 μm . Do wyznaczenia objętości guza wykorzystano następujący wzór:

$$V = (\pi \times 0,06) \times \text{suma wszystkich pól}$$

V - objętość guza w mm^3

0,06 - odległość między kolejnymi skrawkami w mm

π - pole powierzchni i-tego skrawka w mm^2

6.3. Preparatyka tkanki mózgowej do analizy cytometrycznej i sortowania komórek

6.3.1. Przygotowanie pojedynczej zawiesiny komórek z mózgu myszy

Zwierzęta kontrolne oraz poddane terapii uśmiercano w 14, 21 lub 28 dniu po implantacji oraz poddawano perfuzji zimnym PBS-em w celu usunięcia krwinek z mózgu. Następnie wypreparowano mózgi i półkule mózgów z guzem lub całe mózgi (w przypadku zwierząt bez guzów) dysocjowano enzymatycznie. Dysocjację przeprowadzono w urządzeniu GentleMACS Octo Dissociator (Miltenyi Biotec) zgodnie z protokołem producenta, przy użyciu zestawu do dysocjacji tkanki nerwowej z papainą (Miltenyi Biotec) – dla doświadczeń z inhibitorem arginazy lub z wykorzystaniem mieszaniny 0,5 mg/ml DNazy I (DN25, Sigma-Aldrich) i 2,5 mg/ml kolagenazy IV (Merck) w DMEM (Gibco) – do doświadczeń z peptydem RGD. Zastąpienie papainy innymi enzymami wynikało z konieczności zabezpieczenia epitopów komórek CD8⁺. Po obróbce enzymatycznej uzyskaną zawiesinę komórek przefiltrowano przez sitka o średnicach porów kolejno 70 μm i 40 μm , przepłukując roztworem soli HBSS (Hank's Balanced Salt Solution) z wapniem i magnezem (Gibco), i następnie odwirowano przy 300 g, 4°C przez 10 min. W celu usunięcia mieliny, osad zawieszono w 25 ml zimnego roztworu (o składzie: 18,9 mL buforu gradientowego zawierającego 5,65 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{H}_2\text{O}$, 20 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4\cdot 2(\text{H}_2\text{O})$, 135 mM NaCl, 5 mM KCl, 10 mM glukoza, pH 7,4; 5,5 ml Percoll (GE Healthcare); 0,6 ml 1,5 M NaCl), na który delikatnie nawarstwiono 5 ml zimnego PBS i całość odwirowano przez 20 min przy 950 g i 4°C,

bez przyspieszania i hamulców. Po odwirowaniu, oddzieloną warstwę mieliny ostrożnie usunięto z powierzchni styku warstwy PBS i warstwy dolnej, a następnie odciągnięto pozostały supernatant. Osad komórkowy zawieszono w buforze PBS i zliczono komórki wykorzystując urządzenie NucleoCounter (Chemometec).

6.3.2. Cytometria przepływowa

Bezpośrednio po dysocjacji tkanki mózgu przeprowadzono procedurę barwienia do analizy metodą cytometrii przepływowej. Próbkę trzymano na lodzie bez ekspozycji na światło. Przed wybarwieniem przeciwciałami, komórki zawieszono w LiveDead Fixable Violet Dead Stain (ThermoFisher) lub Fixable Viability Dye eF506 (eBioscience) (1:1000 w PBS) i inkubowano przez 10 min w celu wyznakowania i wykluczenia w dalszej analizie komórek martwych. Równolegle przygotowywano kontrolę pozytywną do tego oznaczenia uśmiercając niewielką porcję komórek z zawiesiny przez 10 min Arg1 w temperaturze 60°C. W kolejnym etapie komórki przepłukano buforem FACS Stain (BD Pharmingen), zawieszono w CD16/CD32 Fc Block™ (BD Pharmingen) rozcieńczonym w stosunku 1:250 i inkubowano przez 10 min, w celu zablokowania receptorów FcγRIII/II i zmniejszenia niespecyficznego wiązania przeciwciał. Następnie do zawiesiny komórek dodawano przygotowy wcześniej roztwór przeciwciał (specyfikacje przeciwciał i rozcieńczenia - tabela 2). Do wykrywania antygenów powierzchniowych komórek wykorzystano następujące przeciwciała (nazwa klonu w nawiasie): CD45 (30-F11), CD11b (M1/70), CD3e (145-2C11), CD8a (53-6,7), CD4 (GK1,5), CD25 (PC61,5), CD44 (IM7), CD49d (R1-2), CD62L (MEL-14), CD137 (17B5), CD274 (MH5), CD279 (J43), F4/80 (BM8), Ly6C (AL-21), Ly6G (1A8), CD11c (N418), NK1.1 (PK136). W przypadku barwienia białek wewnątrzkomórkowych, Arg1, Ki67 i Foxp3, komórki utrwalano w specjalnym buforze (bufor do utrwalania/permeabilizacji Foxp3, eBioscience), a następnie inkubowano z odpowiednio rozcieńczonymi przeciwciałami.

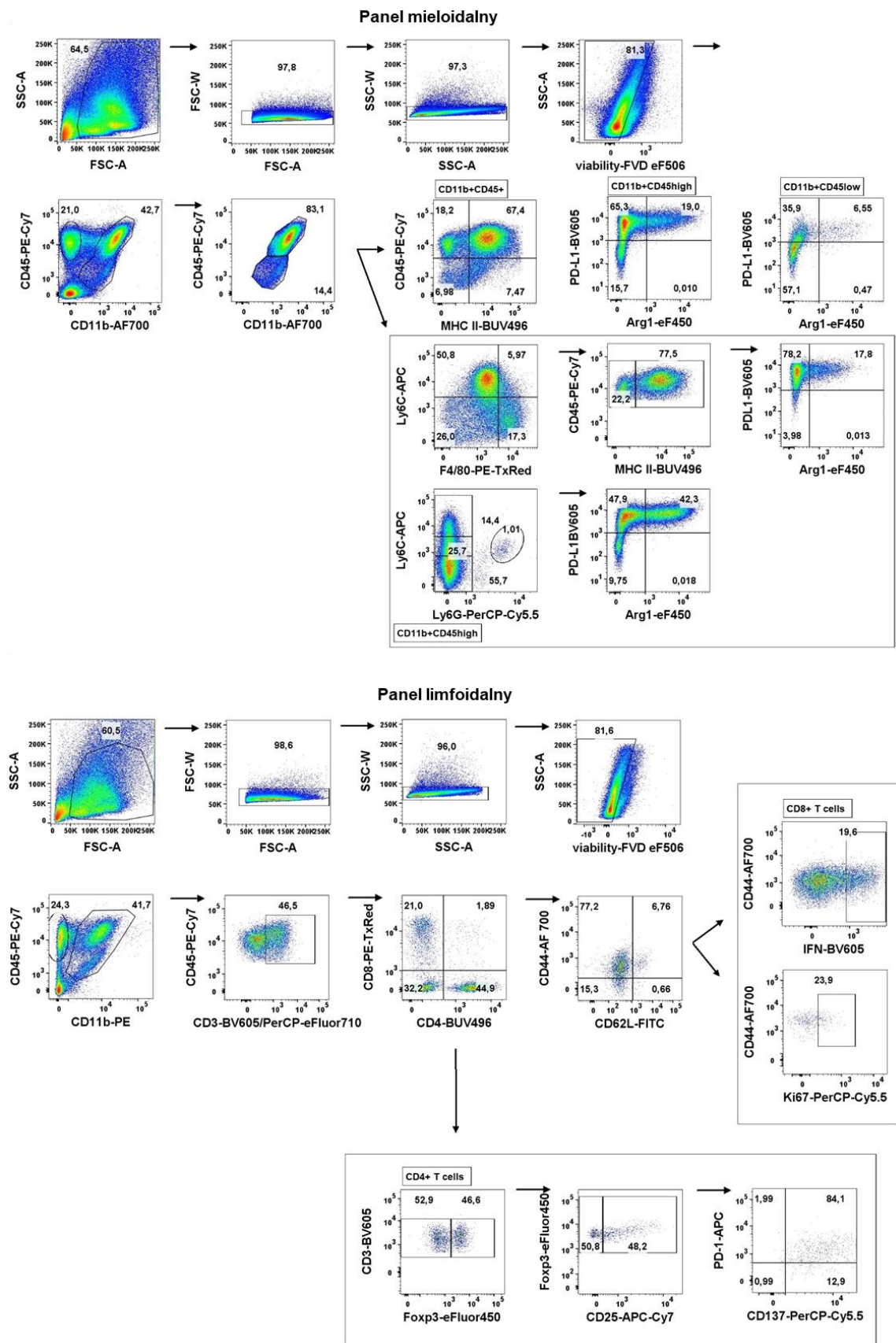
W celu oceny poziomu produkcji cytokiny, świeżo wyizolowane komórki z półkul mózgowych zawieszono w pożywce hodowlanej zawierającej: 50 ng/ml PMA, 1 µg/ml jonomycyny (Sigma Aldrich) oraz koktajl inhibitorów transportu białek (brefeldyna, monenzyna w końcowych stężeniach odpowiednio 10,6 µM i 0,2 mM; Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) na 4 godziny. Następnie komórki te były procesowane w celu barwienia antygenów powierzchniowych i wewnątrzkomórkowych (cytokiny zostały zatrzymane wewnątrz komórek), jak opisano powyżej.

Wszystkie przeciwciała zostały zmiareczkowane przed barwieniem w celu ustalenia ilości dającej najlepszy wskaźnik barwienia. Dane pozyskano za pomocą cytometru BD LSR Fortessa Analyzer i przeanalizowano za pomocą oprogramowania FlowJo (v. 10.5.3, FlowJo LLC, BD). Strategie bramkowania przedstawiono na Schemacie 6. Bramki ustawiono na podstawie kontroli FMO (ang. *fluorescence-minus-one*). Do analiz tSNE każda próbka została poddana przetworzeniu „downsample”, aby uzyskać 10 000 komórek CD45⁺CD11b⁺ (w przypadku analizy dla komórek mieloidalnych) lub CD45⁺CD11b⁻ (w przypadku analizy dla komórek limfoidalnych). Następnie wszystkie próbki zostały połączone i przetworzone przy użyciu określonych wtyczek w FlowJo v10. Procedura cytometrii prowadzona była we współpracy z dr Julianem Swatlerem z Laboratorium Cytometrii oraz dr Salvadorem Cyranowskim z Pracowni Neurobiologii Molekularnej Instytutu Nenckiego.

Tabela 2. Lista przeciwciał oraz odczynników użytych do cytometrii przepływowej

Przeciwciało	Pochodzenie	Numer katalogowy	Rozcieńczenie
Arginase 1 Monoclonal Antibody (A1exF5), eFluor 450	Life Technologies Corp. Carlsbad, CA, USA	48-3697-82	1:100
CD3e (145-2C11), Hamster Anti-Mouse, BV605	BD	563004	1:100
CD8a Monoclonal Antibody (53-6.7) PE-eFluor 610	Life Technologies Corp. Carlsbad, CA, USA	61-0081-82	1:200
CD4 Rat Anti-Mouse BUV496	BD	741051	1:200
CD11b Rat Anti-Mouse (M1/70), FITC	BD	553310	1:800
CD11b Rat Anti-Mouse (M1/70) PE	BD	553311	1:800
CD11b Rat Anti-Mouse (M1/70) AF-700	BD	557960	1:800
CD25 Monoclonal Antibody (PC61.5) APC-eFluor 780	Life Technologies Corp. Carlsbad, CA, USA	47-0251-82	1:50
CD44 Monoclonal Antibody (IM7) Alexa Fluor 700	Life Technologies Corp. Carlsbad, CA, USA	56-0441-80	1:100
CD45, Rat Anti-Mouse (30-F11) PE-Cy7	BD	561868	1:800
CD49d Rat Anti-Mouse, FITC	Biolegend	103606	1:400

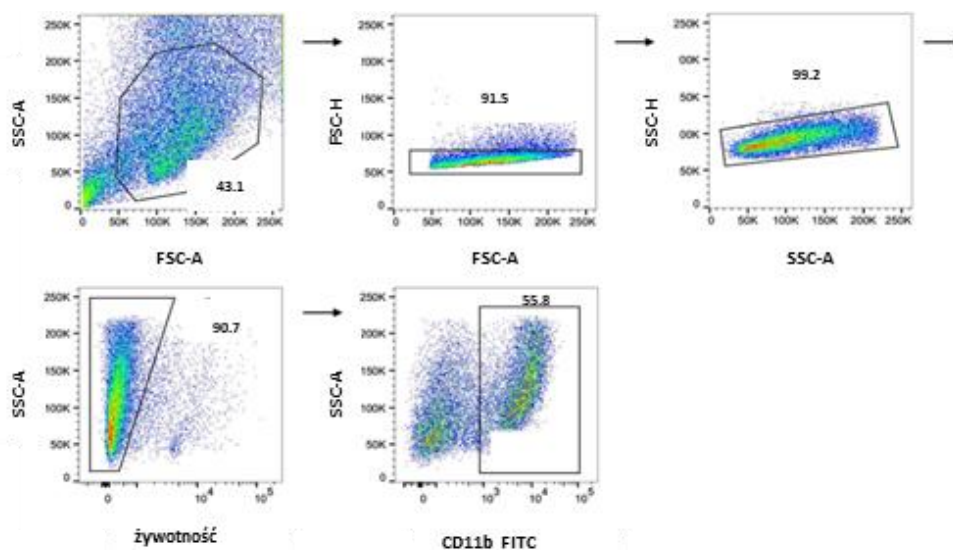
CD62L (L-Selectin) Monoclonal Antibody (MEL-14), FITC	Life Technologies Corp. Carlsbad, CA, USA	11-0621-82	1:400
CD137 Monoclonal Antibody (17B5) PerCP-eFluor 710	Life Technologies Corp. Carlsbad, CA, USA	46-1371-82	1:100
CD274 (PD-L1, B7-H1) Monoclonal Antibody (MIH5), Super Bright 600	Life Technologies Corp. Carlsbad, CA, USA	63-5982-82	1:100
CD279 Hamster Anti-Mouse (J43), APC	BD	562671	1:100
F4/80 Monoclonal Antibody (BM8), PE-eFluor 610	Life Technologies Corp. Carlsbad, CA, USA	61-4801-82	1:100
FOXP3 Monoclonal Antibody (FJK-16s) eFluor 450	Life Technologies Corp. Carlsbad, CA, USA	48-5773-82	1:100
Ly6C Rat Anti-Mouse (AL-21) APC	BD	560595	1:200
Ly6G Rat Anti-Mouse (1A8), PerCP-Cy5.5	BD	560602	1:200
MHC Class I Rat Anti-Mouse (M5/114.15.2), BUV496	BD	750281	1:200
Ki67 Mouse (B56), PerCP-Cy5.5	Biolegend	561284	1:200
IFN, Rat Anti-Mouse, (XMG1.2), BV 605	Biolegend	505840	1:50
Odczynniki			
LiveDead Fixable Violet Dead Cell Stain	ThermoFisher	L34955	1:1000
Fixable Viability Dye eF506	eBioscience	65-0866	1:1000
Stain Buffer	BD Pharmingen	554656	
anti-mouse CD16/CD32 Fc Block	BD Pharmingen	553141	1:250
Protein transport inhibitor cocktail (brefeldin/monomnesin) 500 x	Life Technologies Corp., Carlsbad CA, USA	00-4980	
Ionomycin calcium salt from Streptomyces globatus	Sigma Aldrich; St. Louis, MO, USA	i0634,	



Schemat 6. Strategia bramkowania komórek dla panelu mieloidalnego i limfoidalnego.

6.3.3. Sortowanie komórek CD11b⁺

Bezpośrednio po dysocjacji tkanki mózgu, wyizolowane komórki zostały zawieszone w roztworze LiveDead Fixable Violet Dead Cell Stain (ThermoFisher) w PBS (1:1000), w gęstości $1 \cdot 10^6$ komórek na 100 μ l, aby wyznakować i wyeliminować martwe komórki z późniejszych etapów analizy. Po 10 min inkubacji w temperaturze 4°C komórki przemyto dwukrotnie buforem (FACS Stain BD Pharmingen) i zawieszono w roztworze CD16/CD32 FcBlock™ (BD Pharmingen) w gęstości $1 \cdot 10^6$ komórek na 100 μ l, w celu zablokowania niespecyficznego wiązania przeciwciał. Komórki barwiono przeciwciałem CD11b (klon M1/70) znakowanym FITC (BD Pharmingen) i CD45 (klon 30-F1) znakowanym PE-Cy7 (BD Pharmingen) przez 20 min w temperaturze 4 °C. Następnie komórki zostały dwukrotnie przepłukane buforem FACS Stain i sortowane do 20% FBS w PBS. Procedura sortowania komórek została wykonana w Pracowni Cytometrii Przepływowej Instytutu Nenckiego, zgodnie z ustaloną strategią bramkowania (Schemat 7).



Schemat 7. Strategia bramkowania komórek CD11b⁺ poddanych sortowaniu

6.4. Izolacja RNA

Bezpośrednio po wysortowaniu, komórki CD11b⁺ odwirowano i poddano lizie w celu dalszej izolacji RNA przeprowadzanej przy użyciu zestawu RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen), zgodnie z protokołem producenta. Zarówno współczynnik integralności RNA (RIN, RNA Integrity Number), jak i stężenie wyizolowanego RNA oceniano przy użyciu

zestawu do elektroforezy mikrokapilarnej (2100 Bioanalyzer, Agilent) i oprogramowania 2100 Expert (Agilent).

6.5. Przygotowanie biblioteki mRNA i sekwencjonowanie RNA

Do sekwencjonowania przygotowano niciowo-specyficzne biblioteki mRNA (2-4 powtórzenia biologiczne / grupę doświadczalną) przy użyciu zestawu KAPA Stranded mRNA-Seq Kit (Kapa Biosystems, MA, USA). mRNA zawierające ogony poli-A oczyszczono ze 100 ng całkowitego RNA przy użyciu kulek magnetycznych oligo-poli-T (Kapa Biosystems, MA, USA). Następnie mRNA zostało pofragmentowane, a pierwsza nici cDNA została zsyntetyzowana przy użyciu odwrotnej transkryptazy i losowych starterów (*random hexamers*). W celu uzyskania dwuniciowych (ds) cDNA, po usunięciu matrycy RNA przeprowadzono syntezę drugiej nici cDNA, do której wbudowywane było dUTP zamiast dTTP. Do nici dsDNA dodano następnie zasady "A" do końców 3' i poddano je ligacji z adapterami z firmy NEB, po czym przeprowadzono trawienie uracylu przez enzym USER (NEB, MA, USA). Amplifikację fragmentów z przyłączonymi adapterami na obu końcach przeprowadzono metodą PCR przy użyciu starterów zawierających barkody TruSeq (NEB, Ipswich, MA, USA). Końcowe biblioteki analizowano przy użyciu urządzenia Bioanalyzer i chipów Agilent DNA High Sensitivity (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) w celu potwierdzenia wielkości fragmentów (~300 pz). Oznaczanie ilościowe przeprowadzono przy użyciu fluorymetru Quantus i zestawu do pomiaru stężenia dsDNA QuantiFluor dsDNA System (Promega, Madison, Wisconsin, USA). Biblioteki nakładano na płytkę przepływową w stężeniu 8,5 pM i poddawano sekwencjonowaniu w trybie „*rapid run*” z użyciem platformy Illumina HiSeq 1500. Sekwencjonowanie przeprowadzono we współpracy z dr Bartłomiejem Gielniewskim i dr Bartoszem Wojtasiem z Pracowni Sekwencjonowania.

6.6. Przetwarzanie i analiza danych

Za pomocą narzędzia Trimmomatic (Bolger, Lohse, i Usadel 2014) (wersja 0.36) odflitrowano niskiej jakości odczyty z plików FASTQ. Uzyskane odczyty sekwencjonowania RNA dopasowano do referencyjnej sekwencji genomu myszy (mm10) za pomocą STAR aligner (Dobin i in. 2013) (wersja 2.6.1b) przy użyciu opcji two-pass Mode Basic. Zdublikowane odczyty zostały następnie zidentyfikowane i oznaczone za pomocą Picard Tools (wersja 2.17.1) (broadinstitute.github.io/picard/).

Kwantyfikację odczytów przypisanych do genów przeprowadzono przy użyciu narzędzia bioinformatycznego HTSeq-count (wersja 0.11.1), z włączonym trybem „paired mode” (-p) i trybem „reverse stranded mode” (-s reverse). W analizie użyto tylko odczyty z wartościami MapQ równymi 10 lub wyższymi, pozostałe odfiltrowano. Analizę różnicowej ekspresji genów wykonano wykorzystując metody NOIseq lub DESeq. W doświadczeniu z użyciem OAT-1746, aby zidentyfikować różnice transkryptomiczne między grupami, przeprowadzono analizę różnicowej ekspresji genów przy użyciu metody DESeq. Zwierzęta kontrolne (z guzem, lecz nieotrzymujące żadnej z badanych substancji) przyjęto za grupę odniesienia i porównano wyniki dla próbek z tej grupy z grupami OAT-1746, anty-PD-1 oraz kombinacją. Natomiast w doświadczeniu z użyciem peptydu RGD, przeprowadzono analizę różnicowej ekspresji genów przy użyciu metody NOIseq, przyjmując za grupę odniesienia zwierzęta z guzem, które otrzymywały poprzez pompy osmotyczne jedynie wodę. W celu identyfikacji zestawów genów nadreprezentowanych w wynikach analizy różnicowej ekspresji genów przeprowadzono analizy wzbogacenia wybierając w pierwszym kroku geny, których ekspresja zmieniała się pomiędzy grupami w sposób statystycznie istotny (skorygowane wartości $p \leq 0,05$) lub alternatywnie przy użyciu narzędzia fgsea na genach uszeregowanych według krotności zmiany. W analizach wykorzystano zbiory genów powiązanych z określonymi szlakami i funkcjami biologicznymi według definicji baz danych KEGG i GO. Do wizualizacji danych zostały użyte pakiety R, takie jak: clusterProfiler (ref), VennDiagram i ggplot2. Analizy wykonano we współpracy z dr Adria – Jaume Roura i Szymonem Baluszkiem z Pracowni Neurobiologii Molekularnej.

6.7. Barwienie immunofluorescencyjne

W celu przygotowania materiału do barwienia immunohistochemicznego bezpośrednio po uśmierceniu zwierzęcia wypreparowaną tkankę mózgu zamrożono w podłożu do zamrażania tkanek (Leica Biosystems, Richmond, IL, USA) i pocięto na skrawki o średnicy 12 μm za pomocą kriostatu. Skrawki umieszczano na szkiełkach podstawowych i przechowywano w temperaturze -80°C . Bezpośrednio przed barwieniem szkiełka suszono w temperaturze pokojowej przez 2 godz.. Blokowanie miejsc nieswoistego wiązania przeciwciał przeprowadzono przez 1 godz. w temperaturze pokojowej w roztworze blokującym o składzie 10% surowica ośla i 0,1% TritonX 100 w

PBS. Preparaty inkubowano w roztworze przeciwciał pierwszorzędowych: królicze przeciwciało anti-Iba-1, kozie anti-Arg1 lub szczurze anti-CD8. Następnego dnia preparaty płukano trzykrotnie przez 5 min w PBS i inkubowano przez 2 godz. w ciemności z roztworem przeciwciał II-rzędowych w temperaturze pokojowej. Wszystkie przeciwciała rozcieńczono w 0,1% roztworze Triton X-100/PBS zawierającym 3% surowicy oślej. Po zakończeniu inkubacji z przeciwciałami II-rzędowymi wykonywano barwienie jąder komórkowych odczynnikami DAPI (4',6-diamidyno-2-fenyloindol) (Vectashield Mounting Medium, Vector Labs) w stężeniu 1:1000 w PBS. Następnie preparaty zamykano szkiełkiem nakrywkowym w Fluorescent Mounting Medium (Dako) zapobiegającym wygaszaniu fluorescencji. Preparaty analizowano za pomocą mikroskopu Olympus (Fluoview, FV10i) oraz mikroskopu fluorescencyjnego Leica DM4000B.

Tabela 3. Przeciwciała używane w barwieniach immunohistochemicznych.

Antygen rozpoznawany przez przeciwciało	Producent	Rozcieńczenie przeciwciała I-rzędowego	Przeciwciało II-rzędowe	Rozcieńczenie przeciwciała II-rzędowego
Iba-1	Dako	1:1000	Anty-królicze IgG sprzężone z Alexa Fluor 488	1:1000
Arg-1	Novus	1:100	Anty-kozie IgG sprzężone z Alexa Fluor 555	1:1000
CD8	Abcam	1:200	Anty-szczurze IgG sprzężone z Alexa Fluor 488	1:1000

6.8. Oznaczenie stężenia L-argininy oraz OAT-1746 w osoczu i homogenatach mózgów

W celu oznaczenia L-argininy zebrano osocze oraz mózgi od zwierząt kontrolnych i otrzymujących OAT-1746. Próbkę poddano homogenizacji w 5% kwasie trichlorooctowym, a następnie zmierzono stężenie substratu arginazy przy użyciu

chromatografii ciekowej połączonej ze spektrometrią mas (LC-MS). W cyklu mocznikowym arginaza rozszczepia argininę, tworząc mocznik i ornitynę. Ornityna reaguje z fosforanem karbamoilu, tworząc cytrulinę.

W homogenatach mózgowych przygotowanych do pomiarów L-argininy oraz w próbkach osocza określano również stężenia leku OAT-1746, który podano zwierzętom 2 godziny przed uśmierceniem, wykorzystując metodę LC-MS. Doświadczenia wykonane zostały we współpracy z firmą Molecure S.A.

6.9. Ocena stabilności peptydu RGD

Peptyd RGD rozpuszczono w wodzie w stężeniu 2 mg/ml i inkubowano w pompie osmotycznej przez 1, 7 i 14 dni w temperaturze 37°C. Badanie stabilności peptydu zostało przeprowadzone w Laboratorium Badań Strukturalnych i Fizyko-Chemicznych CePT UW przez Mgr Bartłomieja Fedorczyka. Do badań wykorzystano wysokorozdzielczy spektrometr mas LCMS-IT-TOF, sprzężony z HPLC Prominence z detektorem PDA, wyposażony w pułapkę jonową (IT), detektor czasu przelotu (TOF) oraz źródło jonów elektrosprej (ESI). Widma masowe zostały zarejestrowane w trybie jonów dodatnich, przy użyciu oprogramowania LCMS solution dostarczonego przez firmę Shimadzu.

WARUNKI HPLC:

- kolumna chromatograficzna: Jupiter Proteo C12, 2.1 x 250 mm, 4 µm, Phenomenex
- faza A: 0.1 % HCOOH w wodzie MilliQ
- faza B: 0.1 % HCOOH w ACN
- nastrzyk: 1 µl
- przepływ: 0.35 ml/min
- czas analizy 55 min
- temperatura pieca: 30 °C
- detektor PDA: 190-800 nm
- gradient: 0-25min 50% B, 25-30 min 95% B, 30-35 min 95% B, 35-40 min 5% B, 40 - 55 min 5B.

WARUNKI MS:

- źródło jonów: ESI
- tryb jonizacji: dodatni
- zakres mas: 100 - 2000 Da
- akumulacja jonów: 10 ms
- temperatura interfejsu: 250 °C
- temperatura bloku grzewczego: 520 °C
- przepływ gazu rozpylającego: 1,5 l/min

6.10. Pomiar stężenia cytokin w homogenatach mózgowych oraz we krwi

Cytokiny pro- i przeciwzapalne mierzono we krwi i homogenatach mózgu zwierząt zdrowych, zwierząt z guzem oraz zwierząt z guzem, którym podawano badane substancje lub ich kombinacje. Krew pobierano przed perfuzją. Aby uzyskać surowicę, krew pozostawiono na 30 min do skrzepnięcia, a następnie próbki odwirowano (1000 × g, 10 min w temperaturze pokojowej). Surowicę pobrano i przechowywano w temperaturze -80°C. Krew do doświadczeń z OAT-1746 została pobrana do próbek z antykoagulantem (EDTA). Następnie próbki te odwirowano (1000× g, 10 min w temperaturze pokojowej). Osocze zebrano i przechowywano w temperaturze -80°C do czasu wykonawania oznaczeń.

Homogenaty mózgu przygotowano poprzez dodanie równej objętości buforu do lizy komórkowej (Cell Lysis Buffer 2, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) do zdysocjowanych tkanek mózgowych. Próbki inkubowano następnie w temperaturze pokojowej przez 30 min, a zanieczyszczenia usunięto przez odwirowanie. Próbki przechowywano w temperaturze -80°C.

Poziomy cytokin mierzono za pomocą zestawu Luminex Assay Mouse Premixed Multi-Analyte Kit (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), zgodnie z protokołem. Technologia ta opiera się na użyciu mieszaniny kulek polistyrenowych, które opłaszczane są specyficznymi przeciwciałami rozpoznającymi badane białka w próbce (kulki do pomiaru konkretnej cytokiny mają określony rozmiar i intensywność fluorescencji). Do oznaczenia wykorzystano urządzenie MAGPIX (Luminex, TX, USA) z oprogramowaniem XPonent. Wyniki dla każdej cytokiny wyrażono w pg/ml dla próbek surowicy i pg/mg białka dla homogenatów mózgu. Stężenie białka w homogenatach

mózgu oszacowano za pomocą odczynnika Bradforda (SigmaAldrich), a gęstości optyczne przy długości fali 570 nm zmierzono za pomocą czytnika płytek Synergy HTX (BioTek).

6.11. Analiza statystyczna

Wyniki liczbowe przedstawiono jako średnią $\pm$ SD (standard deviation). Analizę statystyczną różnic pomiędzy badanymi grupami przeprowadzono z wykorzystaniem testu t-studenta lub U Manna-Withneya (dla dwóch porównywanych grup) oraz jednokierunkowej analizy wariancji ANOVA (dla porównań wielowariantowych), stosując program GraphPad Prism. Różnice uznawane za istotne statystycznie określono jako : * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

6.12. Programy graficzne

Schematy 1-5 we Wstępie oraz w rozdziale Materiały i Metody zostały przygotowane w programie BioRender.com

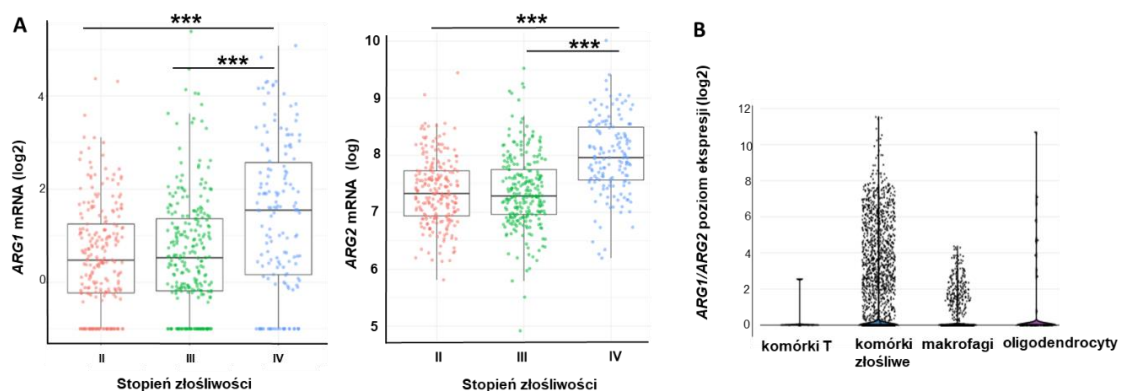
7. WYNIKI

7.1. Ocena przeciwnowotworowego działania inhibitora arginazy oraz jego wpływu na wzrost glejaka u myszy w połączeniu z przeciwciałem anty-PD-1

Inhibitor arginazy OAT-1746 został zaprojektowany i zsyntetyzowany w Molecure S.A. w Warszawie. Badania prowadzone przez firmę Molecure z wykorzystaniem OAT-1746 wykazały, iż związek ten hamuje ARG1/2 w niskich stężeniach nanomolowych. Ponadto wykazano jego znaczną skuteczność przeciwnowotworową w różnych modelach nowotworów innych niż glejak. OAT-1746 i dwa związki referencyjne zbadano w testach biochemicznych pod kątem zdolności do hamowania aktywności arginazy. OAT-1746 hamował aktywność rekombinowanej ludzkiej ARG1 lepiej niż dwa związki referencyjne (Pilanc i wsp., 2021). Wyniki te wskazują na skuteczność nowego związku w badaniach przedklinicznych. W niniejszej rozprawie oceniono przeciwnowotworowe działanie nowego inhibitora w mysim modelu glejaka GL261.

7.1.1. Określenie ekspresji *ARG1/ARG2* w próbkach ludzkich glejaków

Korzystając z danych transkryptomicznych z bazy danych TCGA (ang. *The Cancer Genome Atlas*) zbadano poziom ekspresji *ARG1* oraz *ARG2* w ludzkich glejakach o różnym stopniu złośliwości (ang. *grade*, G): G2, 3, 4 według WHO. Najwyższy poziom mRNA stwierdzono w glejakach złośliwych G4 (**Rycina 1A**). W celu określenia komórkowego źródła *ARG1* oraz *ARG2* w GBM wykorzystano publiczne dane z sekwencjonowania pojedynczych komórek z 10 próbek guzów od pacjentów udostępnione na portalu SingleCell (<https://singlecell.broadinstitute.org/>) i sprawdzono ekspresję tych genów w różnych populacjach komórek. W analizowanym zbiorze danych wyróżniono 4 typy komórek: komórki złośliwe, makrofagi, oligodendrocyty oraz limfocyty cytotoksyczne T. Stwierdzono, że ekspresja *ARG1* oraz *ARG2* występuje głównie w komórkach złośliwych oraz w mniejszym stopniu GAMs (**Rycina 1B**)



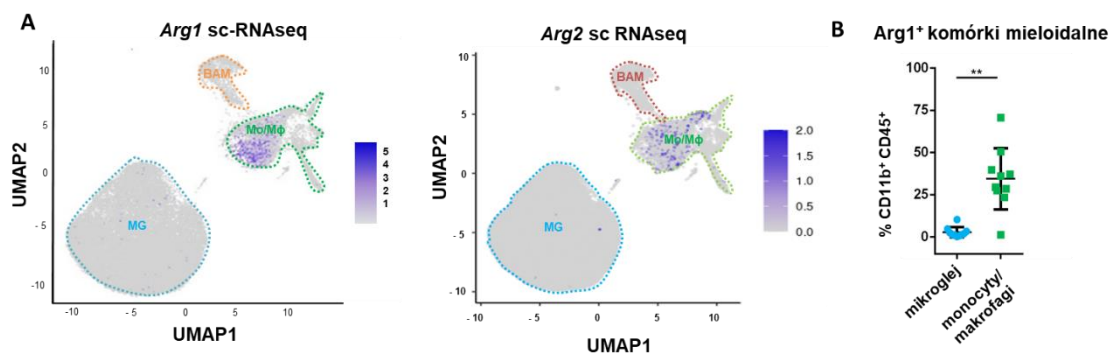
Rycina 1. Ocena ekspresji arginaz w próbkach ludzkich glejaków.

(A) Ekspresja ARG1 oraz ARG2 w glejakach różnego stopnia złośliwości (G2-G4 wg WHO) w zbiorach danych TCGA. Istotność statystyczna została określona testem Honest Significant Difference (HSD) Tukeya; $p < 0,001$. (B) Ekspresja ARG1 oraz ARG2 w komórkach złośliwych i GAMs (makrofagi) w 10 próbkach GBM z sekwencjonowania pojedynczych komórek (dane publiczne).

7.1.2. Określenie typu komórek wykazujących ekspresję Arg1 w mysim glejaku GL261

Wykorzystując dane z sekwencjonowania RNA pojedynczych komórek (scRNAseq, ang. *single-cell RNA sequencing*) w populacji komórek CD11b⁺ (uzyskane w Pracowni Neurobiologii Molekularnej), wyizolowanych z guzów u myszy w 14 dniu po implantacji komórek mysiego glejaka GL261, przeanalizowano ekspresję *Arg1* oraz *Arg2* w odrębnych subpopulacjach. Stwierdzono, że niewielki odsetek komórek mikrogleju wykazuje ekspresję *Arg1* (< 1%) lub *Arg2* (<0,1%). Oba geny miały wyższą ekspresję w populacji Mo/MΦ (odpowiednio 11% i 6% komórek wykazujących ekspresję danego genu). Poziomy ekspresji *Arg1* były znacznie wyższe niż poziomy mRNA *Arg2*, zarówno w mikrogleju, jak i Mo / MΦ (**Rycina 2A**).

W celu potwierdzenia danych transkryptomicznych, oceniono poziom białka Arg1 za pomocą cytometrii przepływowej w wyizolowanych komórkach CD11b⁺ z półkul mózgu zwierząt z glejakiem w 21 dniu po implantacji komórek glejaka GL261 (**Rycina 2B**). Odsetek komórek Arg1⁺ był wyższy w Mo/MΦ naciekających z krwi obwodowej (CD11b⁺CD45^{wysoki}) niż w rezydentnym mikrogleju (CD11b⁺CD45^{low}), co było zbieżne z wynikami analizy scRNA-seq.



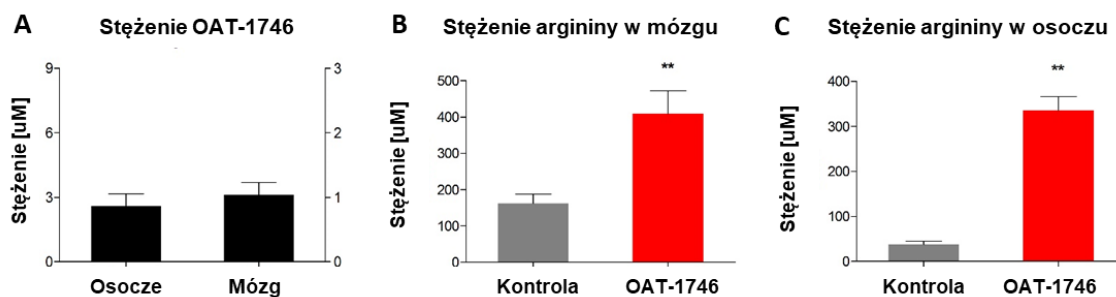
Rycina 2. Ekspresja Arg1/Arg2 w mysim glejaku GL261.

(A) Wykresy UMAP komórek CD11b⁺ z glejaków GL261 (n = 8). Klastry zidentyfikowano jako mikroglej, monocyty/makrofagi (Mo/ MΦ) i BAM. Wykresy przedstawiające osobno mRNA *Arg1* oraz *Arg2* świadczące o wysokiej ekspresji w populacji Mo/MΦ. (B) Analiza cytometryczna poziomu Arg1 w komórkach mikrogleju (CD11b⁺ CD45^{niskie}) i Mo/MΦ (CD11b⁺ CD45^{niskie}) w mysim glejaku GL261 (n = 10); Wilcoxon test **p < 0,01.

Wyniki te pokazały, że w mysim glejaku GL261 dominującą izoformą jest Arg1, a za wysoki poziom tego białka w guzie odpowiadają w większym stopniu makrofagi naciekające glejaka niż rezydentny mikroglej.

7.1.3. Ocena biodystrybucji i aktywności *in vivo* inhibitora arginazy OAT-1746 u myszy z glejakiem

Przed przystąpieniem do oceny działania przeciwnowotworowego inhibitora arginazy OAT-1746 w glejaku, sprawdzono czy inhibitor arginazy przechodzi przez barierę krew-mózg i czy wywołuje spodziewany efekt na aktywność enzymu. OAT-1746 podawano dożołądkowo (50 mg/kg) dwa razy dziennie, począwszy od pierwszego dnia po implantacji komórek GL261 do mózgu myszy C57BL/6J. Myszy kontrolne otrzymywały sól fizjologiczną dożołądkowo w tym samym schemacie podawania. Po 14 dniach podawania OAT-1746, zmierzono bezpośrednio poziom związku, a także poziom L-argininy – substratu arginazy, w mózgu i osoczu myszy. Mózg i osocze pobrano 2 godziny po podaniu ostatniej dawki związku. W ekstraktach mózgu wykryto OAT-1746, co potwierdza, że związek przekracza BBB i gromadzi się w mózgu (**Rycina 3A**). Ponadto stwierdzono, że podawanie OAT-1746 prowadziło do wzrostu stężenia L-argininy, zarówno w mózgu (**Rycina 3B**), jak i w osoczu krwi (**Rycina 3C**), co wskazuje na zahamowanie rozkładu L-argininy przez arginazę w wyniku działania inhibitora.



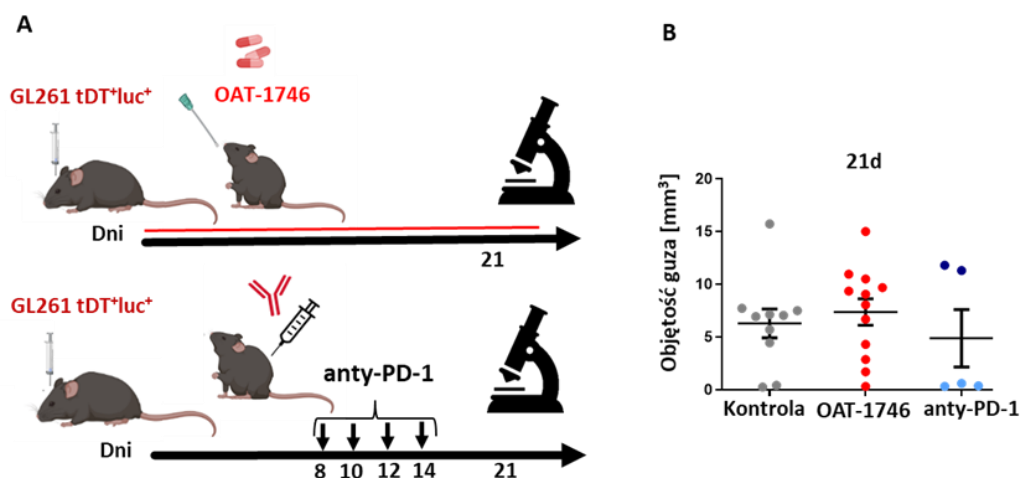
Rycina 3. Poziom OAT-1746 oraz L-argininy w mózgu i osoczu myszy z glejakiem. Po zaimplantowaniu komórek glejaka GL261, myszy otrzymywały sól fizjologiczną (grupa kontrolna) lub OAT-1746 dwa razy dziennie (n = 6 na grupę). Próbki pobrano w 14 dniu po implantacji, w przypadku grupy z OAT-1746 - 2 godziny po ostatnim podaniu inhibitora. **(A)** Stężenia OAT-1746 w osoczu i mózgu oraz **(B)** L-argininy w mózgach myszy z guzem i w **(C)** osoczu tych samych zwierząt mierzono za pomocą spektrometrii mas (LC/MS). Wyniki przedstawiono w postaci wartości średniej $\pm$ SEM, a znamienność statystyczną różnic pomiędzy grupami określono za pomocą testu Manna-Whitneya. ** p < 0,01.

7.1.4. Ocena działania OAT-1746 oraz przeciwciała anti-PD-1 podawanych jako monoterapii na wielkość guza w modelu glejaka u myszy

Aktywność przeciwnowotworową inhibitora arginazy OAT-1746 oraz przeciwciała anti-PD-1 badano w mysim glejaku, po zaimplantowaniu komórek GL261 immunokompetentnym myszom C57BL/6J. Komórki glejaka GL261 stransfekowano uprzednio konstruktami zapewniającymi ekspresję lucyferazy (w celu umożliwienia obrazowania wzrostu guza *in vivo*) i ekspresję białka czerwonej fluorescencji tdTomato (do oceny wielkości guza na podstawie analizy histologicznej skrawków mózgu). Myszy z nowotworem otrzymywały OAT-1746 (50 mg/kg) lub sól fizjologiczną, dwa razy dziennie przez sondę dożołądkową, począwszy od dnia 1 po implantacji komórek glejaka. Osobnej grupie myszy z glejakiem podawano przeciwciało anti-PD-1 (2.5 mg/kg) w postaci iniekcji dootrzewnowych w 8, 10, 12 oraz 14 dniu po implantacji komórek glejaka. Schemat doświadczenia przedstawiono na **Rycinie 4A**.

Po 21 dniach od implantacji komórek glejaka przeprowadzono histologiczną ocenę wielkości guza. Podawanie OAT-1746 nie wpłynęło na wielkości guzów w porównaniu z grupą kontrolną. Jednakże wśród zwierząt, którym podano anti-PD-1 widoczny był podział na dwie grupy z guzami o wyraźnie różnej wielkości (**Rycina 4B**). Jest to zgodne z obserwowanym u pacjentów z nowotworem dwójakim sposobem reakcji na leczenie: część pacjentów odpowiada, a część nie odpowiada na terapię anti-PD-1. Uzyskane wyniki wskazywały, iż podawanie inhibitora nie wpływało na wielkość guzów.

Natomiast przeciwciało anti-PD-1 powodowało zmniejszenie wielkości guzów u mniej więcej połowy zwierząt.



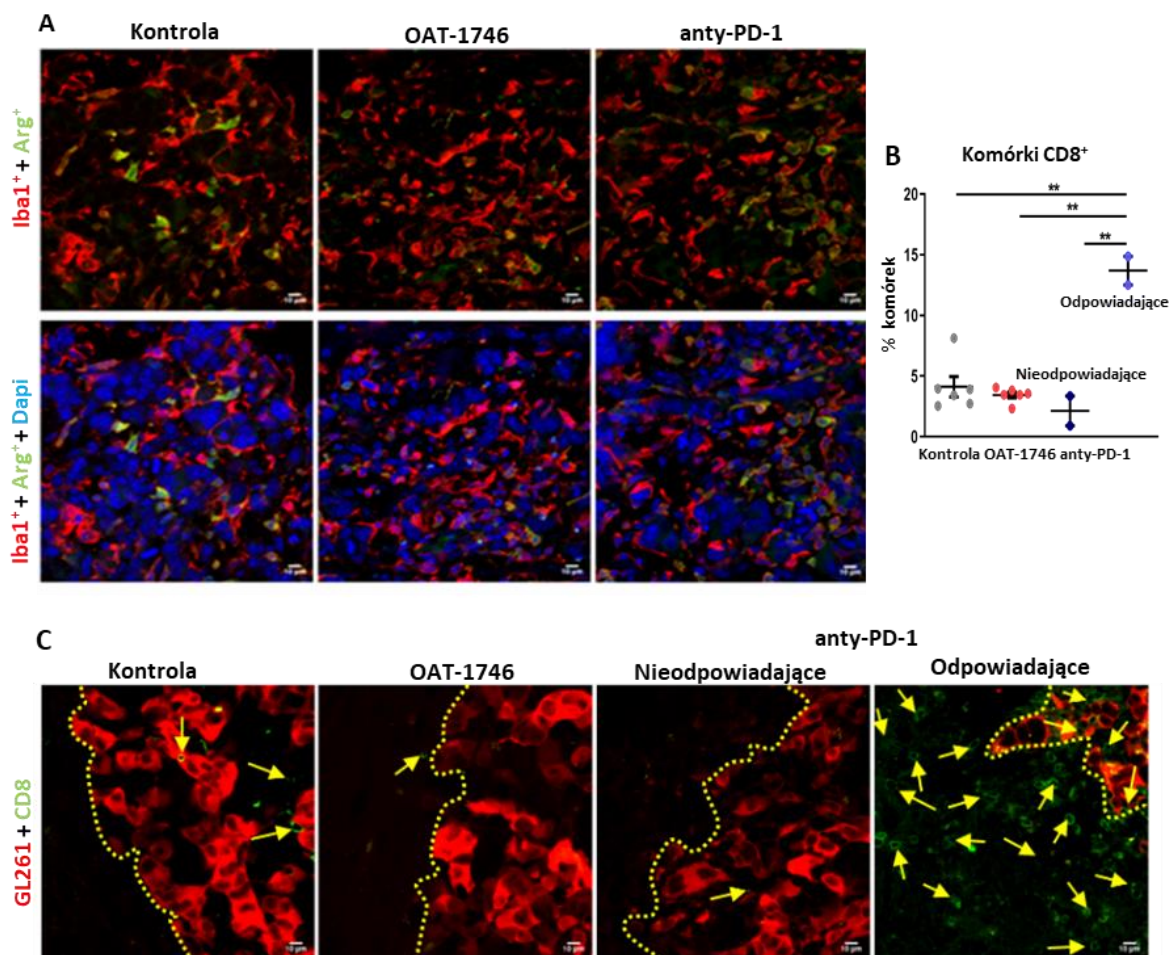
Rycina 4. Ocena działania OAT-1746 oraz przeciwciała anti-PD-1 na wzrost guzów u myszy.

(A) Schemat doświadczenia. Myszy z zaimplantowanymi komórkami glejaka GL261 tDT⁺ luc⁺ otrzymywały dożołądkowo sól fizjologiczną (Kontrola) lub OAT-1746, 50 mg/kg, dwa razy dziennie przez 21 dni (n=12/grupę). Osobna grupa otrzymywała przeciwciało anti-PD-1 (2,5 mg/kg, dootrzewnowo) w 8, 10, 12 i 14 dniu po implantacji komórek (n=5). **(B)** Pomiar objętości guza w 21 dniu po implantacji: Kontrola (n=12), OAT-1746 (n=12) i anti-PD-1 (n=5). W grupie otrzymującej inhibitor punktu kontrolnego myszy nieodpowiadające (n=2) i myszy odpowiadające (n=3) na terapię zaznaczono odpowiednio na ciemno i jasnoniebiesko. Mózgi zostały wyizolowane, utrwalone, pocięte na skrawki. Powierzchnię guza (czerwona fluorescencja) mierzono za pomocą ImageJ w co piątym skrawku mózgu i obliczano objętości guza wg. równania podanego w rozdziale Materiały i Metody; średnie ± SEM, wartości p obliczono za pomocą testu U Manna–Whitneya.

7.1.5. Zbadanie wpływu OAT-1746 oraz przeciwciała anti-PD-1 na wybrane elementy mikrośrodowiska glejaka

W celu scharakteryzowania wpływu inhibitora arginazy oraz przeciwciała anti-PD-1 na wybrane komórki odpornościowe w mikrośrodowisku guza, wykonano barwienie immunohistochemiczne z użyciem przeciwciał wykrywających Arg1 (marker komórek immunosupresyjnych) i Iba1 (ang. *ionized calcium binding adaptor molecule 1*, marker mikrogleju/makrofagów) oraz, na niezależnych skrawkach, z użyciem przeciwciał wykrywających CD8 (marker limfocytów cytotoksycznych T). W oznaczeniach wykorzystano skrawki uzyskane z opisanego powyżej doświadczenia zgodnie ze schematem przedstawionym na Rycinie 4A. W wyniku podawania OAT-1746 lub anti-PD-1 Ab nie dochodziło do zmian w liczbie komórek Iba1⁺ ani komórek podwójnie dodatnich Iba1⁺Arg1⁺ w glejakach u myszy (**Rycina 5A**). Wyniki te są zgodne z informacjami o mechanizmie działania inhibitora OAT-1746, który hamuje aktywność enzymu, ale nie wpływa na poziom białka Arg1. Barwienie w kierunku

cytotoksycznych limfocytów T CD8⁺ wykazało natomiast zwiększoną liczbę tych komórek (zlokalizowanych głównie na marginesie guza) u myszy, które odpowiedziały na podanie anty-PD-1 Ab (**Rycina 5C**), co potwierdziła ocena ilościowa odsetka komórek CD8⁺ w tkance (**Rycina 5B**).

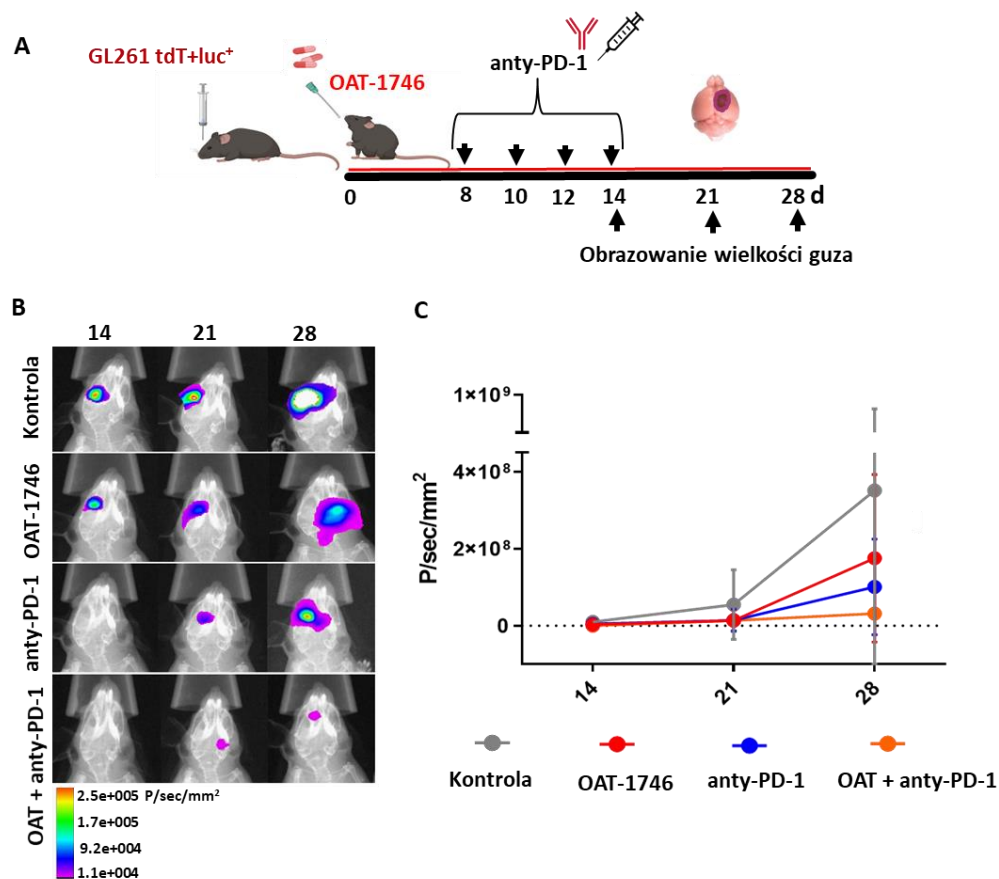


Rycina 5. Wpływ OAT-1746 oraz przeciwciała anty-PD-1 na komórki mieloidalne i limfocyty T w glejaku.

(A) Reprezentatywne obrazy mózgów myszy z glejakiem (w dniu 21 po implantacji) wybarwionych przeciwciałami anty-Iba1 (na czerwono) i anty-Arg1 (na zielono) oraz DAPI. (B) Ilościowa analiza komórek CD8⁺ w odniesieniu do całkowitej liczby komórek w analizowanym obszarze. Komórki zliczono stosując oprogramowanie ImageJ i przedstawiono średnie wartości z 5 pól. Istotność obliczono za pomocą jednokierunkowej analizy ANOVA, do obliczenia wartości p zastosowano test wielokrotnych porównań Bonferroniego (CTR n=6; OAT-1746 n=6, anti-PD-1 Ab n=4); ** p < 0,01. (C) Reprezentatywne obrazy z mikroskopii konfokalnej komórek CD8⁺ w guzach po podaniu OAT-1746 lub przeciwciała anty-PD-1 (anti-PD1 Ab). Żółta linia oddziela obszary guza (z komórkami glejaka GL261tdT⁺ luc⁺ wykazującymi czerwoną fluorescencję); skala 10 μm. Żółte strzałki wskazują komórki CD8⁺ (na zielono) u myszy odpowiadającej na podanie anti-PD1 Ab.

7.1.6. Ocena wpływu OAT-1746 oraz przeciwciała anty-PD-1 na wielkość guza

Duże nadzieje na bardziej skuteczne leczenie przeciwnowotworowe wiąże się z terapiami łączącymi leki modyfikujące immunosupresyjne środowisko guza z inhibitorami punktów kontrolnych (Spranger i wsp., 2013). W kolejnym doświadczeniu sprawdzono wpływ OAT-1746 (podawanego dożołądkowo dwa razy dziennie) w połączeniu z przeciwciałem anty-PD-1 (iniekcje dootrzewnowe w dniu 8, 10, 12 i 14 po implantacji komórek GL261 tdT⁺ luc⁺) na wzrost glejaka u myszy. Schemat doświadczenia przedstawia **Rycina 6A**. Wzrost guzów monitorowano za pomocą pomiaru sygnału luminescencji w 14, 21 i 28 dniu po implantacji komórek glejaka GL261 tdT⁺luc⁺. Reprezentatywne obrazy z nałożenia zebranego sygnału na zdjęcie rentgenowskie głowy zwierzęcia w różnych punktach czasowych pokazano na **Rycinie 6B**. Pomimo iż sam OAT-1746 nie wykazał żadnego wpływu na wielkość guza, a na podawanie anty-PD-1 Ab zareagowała połowa zwierząt, połączenie obu immunomodulatorów spowodowało znaczne zmniejszenie wzrostu guzów po 28 dniach. Wpływ kombinacji immunomodulatorów oceniono za pomocą wieloczynnikowej analizy ANOVA (**Rycina 6C**), uwzględniającej efekt „podawania immunomodulatorów”, jak i „czas od implantacji”. Wyniki te wskazują, że kombinacja immunomodulatorów opóźniała wzrost guza.

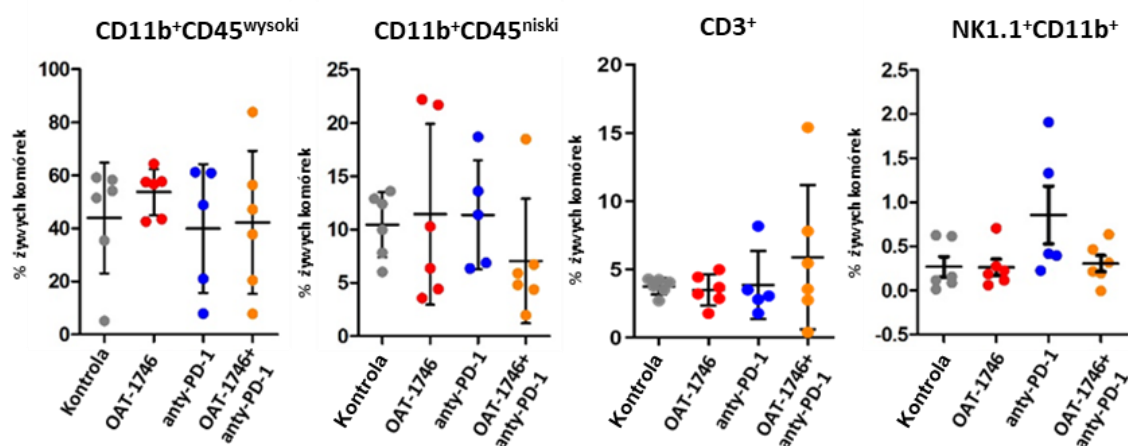


Rycina 6. Ocena działania kombinacji OAT-1746 oraz anti-PD-1 Ab na wzrost guza. (A) Schemat doświadczenia. Myszy, którym zaimplantowano komórki glejaka GL261 tdT⁺Luc⁺ otrzymywały dożołądkowo sól fizjologiczną (Kontrola) lub OAT-1746, 50 mg/kg, dwa razy dziennie przez 28 dni. Osobne grupy otrzymywały przeciwciało anti-PD-1 (2,5 mg/kg, dootrzewnowo) w 8, 10, 12 i 14 dniu po implantacji komórek lub OAT-1746 oraz anti-PD-1 AB (n=12/grupę). (B) Reprezentatywne obrazy bioluminescencji guza uzyskane za pomocą obrazowania przy użyciu platformy do obrazowania przyżyciowego Xtreme. Intensywność koloru reprezentuje względny sygnał lucyferazy. Sygnał nałożono na zdjęcie rentgenowskie. (C) Średnie sygnałów bioluminescencji dla każdej z grup wyznaczono jako foton/sek/mm² w funkcji czasu we wskazanych dniach po implantacji.

7.1.7. Wpływ OAT-1746 oraz przeciwciała anti-PD-1 na mikrośrodowisko glejaka

W celu zbadania wpływu podawania OAT-1746 oraz anti-PD-1 Ab na wybrane populacje komórek odpornościowych w guzie, przeprowadzono immunofenotypowanie metodą cytometrii przepływowej komórek wyizolowanych z mózgów myszy z glejakiem po 28 dniach od implantacji komórek. Podanie OAT-1746 lub anti-PD-1 nie zmieniło odsetka mikrogleju (CD11b⁺CD45^{niski}) ani monocytów i makrofagów pochodzenia obwodowego (CD11b⁺CD45^{wysoki}) w glejakiach doświadczalnych. Zaobserwowano wzrost liczby komórek NK1.1 u zwierząt, którym podano anti-PD-1 Ab w porównaniu z grupą kontrolną, jednak nie osiągnął on istotności statystycznej. U większości zwierząt,

którym podawano OAT-1746 oraz anty-PD-1 Ab zaobserwowano zwiększony odsetek limfocytów T CD3⁺ (**Rycina 7**). Na tym etapie nie dysponowaliśmy niestety zestawem przeciwciał, który pozwoliłby na dokładniejsze scharakteryzowanie komórek w mikrośrodowisku glejaków i ocenę wpływu testowanych związków na profil odpowiedzi odpornościowej.



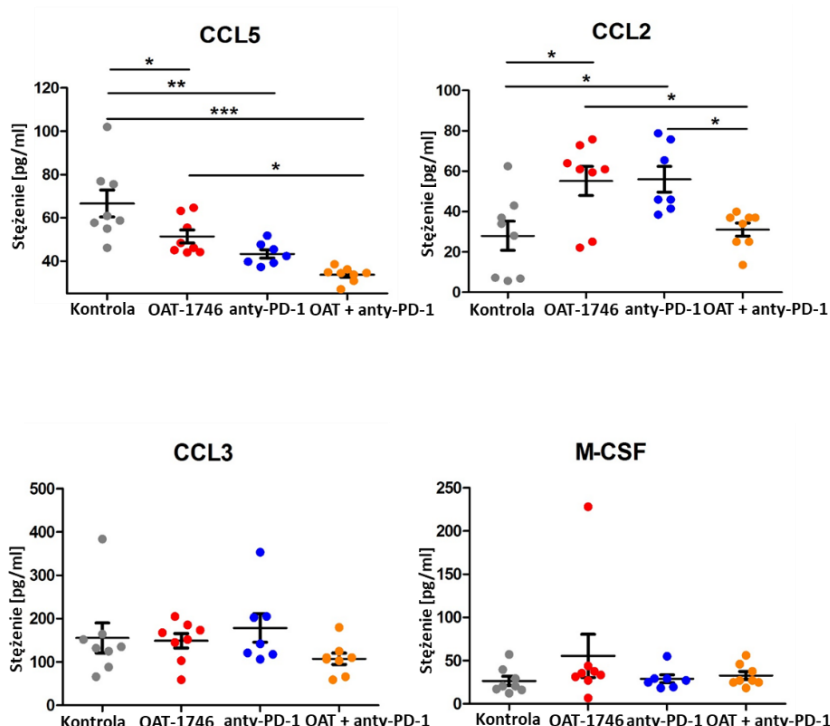
Rycina 7. Profil komórek układu odpornościowego w glejakach oceniony przy użyciu cytometrii przepływowej.

W 28 dniu po implantacji komórek glejaka zwierzęta (n=6/grupę) poddano perfuzji PBS i mózgi po wypreparowaniu poddano dysocjacji w celu uzyskania zawiesiny pojedynczych komórek. Oceniono odsetek monocytów i makrofagów obwodowych (CD11b⁺CD45^{wysoki}), mikrogleju (CD11b⁺CD45^{niski}), komórek CD3⁺ i NK1.1⁺CD11b⁺. Istotność różnic między grupami oceniano za pomocą jednoczynnikowej analizy ANOVA, a następnie testu wielokrotnych porównań Bonferroniego. Nie odnotowano różnic znamiennych statystycznie.

7.1.8. Ocena poziomu cytokin pro- i przeciwzapalnych po podawaniu OAT-1746 oraz anty-PD-1 Ab

Aby uzyskać więcej informacji na temat modulacji mikrośrodowiska guza po podawaniu określonych immunomodulatorów, oznaczono poziom cytokin pro- i przeciwzapalnych we krwi (osoczu) pobranej 2 godz. po ostatnim podaniu OAT-1746 (lub soli fizjologicznej) w 28 dniu po implantacji komórek glejaka. Poziom CCL5 (chemokiny 5 z motywem C-C, ang. *C-C Motif Chemokine Ligand 5*) zmniejszył się, zarówno u zwierząt po podawaniu OAT-1746, jak i anty-PD-1 Ab, a dodatkowo zaobserwowany spadek był znacznie większy u zwierząt po łącznym podawaniu OAT-1746 i anty-PD-1 Ab (**Rycina 8**). Co ciekawe, zwierzęta, którym podawano OAT-1746 lub anty-PD-1 Ab, wykazały wyższy poziom cytokiny CCL2 w porównaniu do grupy kontrolnej, a takiego wzrostu nie stwierdzono u zwierząt otrzymujących OAT-1746 i

anty-PD-1 Ab. Poziomy CCL3 i czynnika stymulującego kolonie makrofagów (M-CSF) nie uległy zmianie w wyniku podawania immunomodulatorów.



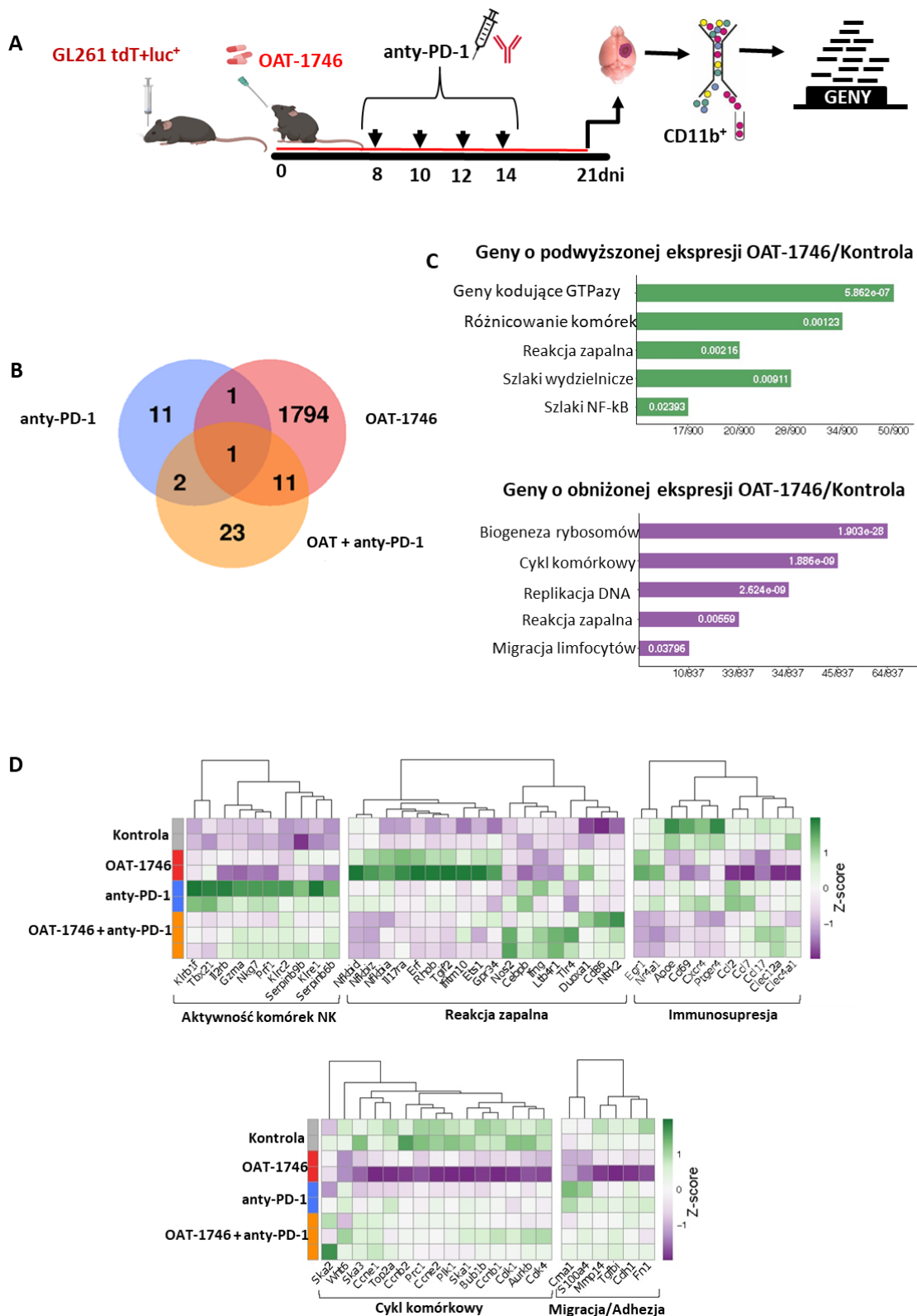
Rycina 8. Wpływ OAT-1746 oraz anty-PD-1 Ab na poziom cytokin w osoczu krwi myszy z glejakiem. Poziomy wybranych cytokin pro/przeciwpalnych określono w osoczu krwi zwierząt z opisanych powyżej grup doświadczalnych, stosując technologię Luminex (MAGPIX) z panelem przeciwciał. Wykresy przedstawiają poziomy badanych cytokin w pg/ml; wyniki przedstawiono jako średnie $\pm$ SEM; n=6-7/grupę; istotność oceniono za pomocą One-Way ANOVA i testu wielokrotnych porównań Bonferroniego, ***p < 0,001; **p < 0,01; * p < 0,05.

7.1.9. Wpływ podawania OAT-1746 z anty-PD-1 Ab na profil transkryptomiczny komórek CD11b⁺ z myszy z glejakiem

Mimo iż inhibitor OAT-1746 nie wykazywał działania przeciwnowotworowego, zwiększał skuteczność przeciwciała anty-PD-1. Aby określić potencjalne mechanizmy obserwowanych zmian porównano profile transkryptomiczne komórek CD11b⁺ wyizolowanych z guzów u myszy kontrolnych oraz takich, którym podawano anty-PD-1 Ab, OAT-1746 lub kombinację OAT-1746+anty-PD-1 Ab. Schemat doświadczenia przedstawiono na **Rycinie 9A**. Przeprowadzono sekwencjonowanie RNA z komórek CD11b⁺, a następnie analizę obliczeniową w celu identyfikacji genów o zróżnicowanej ekspresji i wykrycia zmienionych szlaków sygnałowych. Największy wpływ na transkryptom komórek CD11b⁺ miało podawanie OAT-1746. Wskazano ponad 1800 genów o zróżnicowanej ekspresji w komórkach CD11b⁺ pomiędzy grupą OAT-1746 oraz

grupą kontrolną (**Rycina 9B**). Wśród genów o podwyższonej ekspresji w grupie OAT-1746 wykryto geny zaangażowane w procesy takie jak: przekazywanie sygnału za pośrednictwem GTPaz, różnicowanie komórek mieloidalnych, szlak sygnałowy NF- κ B (czynnik jądrowy kappa B) i regulację reakcji zapalnych. Natomiast geny o obniżonej ekspresji w grupie OAT-1746 zaangażowane były w takie szlaki jak: biogeneza rybosomów, cykl komórkowy i replikacja DNA, co wskazuje na zmniejszoną aktywność proliferacyjną komórek CD11b⁺ związanych z nowotworem w tej grupie zwierząt (**Rycina 9C**). Ekspresja genów związanych z różnicowaniem oraz aktywnością cytotoksyczną komórek NK była znacząco podwyższona po podawaniu anty-PD-1 oraz po kombinacji OAT-1746+anty-PD1 Ab. Do tej grupy zaliczały się geny kodujące białka powierzchniowe komórek NK (*Klrb1f*, *Klre1*, *Klrc2*), cytotoksyczne białko ziarniste (*Nkg7*), czynnik transkrypcyjny T-Box 21 (*Tbx21*), który bierze udział w różnicowaniu komórek NK i regulacji ekspresji IFN γ , a także geny kodujące granzym A (*Gzma*) i perforynę (*Prf1*), które są głównymi czynnikami cytolitycznymi w odpowiedzi przeciwnowotworowej komórek NK. Ponadto, geny takie jak *Serpinb6b* i *Serpinb9b*, które kodują inhibitory proteaz, były podwyższone po podawaniu anty-PD-1 Ab oraz po kombinacji OAT-1746+anty-PD-1. Takie zmiany transkryptomiczne wskazują na zwiększony napływ aktywowanych komórek NK do guza. W komórkach CD11b⁺ u myszy, którym podawano OAT-1746 stwierdzono wysoką ekspresję *Gpr34*, którego poziom wzrasta w mikrogleju podczas zapalenia. Ponadto, po zastosowaniu kombinacji obu immunomodulatorów, zaobserwowano podwyższoną ekspresję genów biorących udział w odpowiedzi przeciwnowotworowej, takich jak geny kodujące syntazę tlenu azotu (*Nos2*), IFN γ (*Ifng*), Tlr4 (*Tlr4*) i CD86 (*CD86*), który dostarcza sygnały kostymulujące niezbędne do aktywacji limfocytów T. Podawanie OAT-1746 spowodowało zmniejszoną ekspresję genów związanych z replikacją DNA i progresją cyklu komórkowego, w tym genu kodującego topoizomerazę 2a (*Top2a*), cykliny B1, E1 i E2 (*Ccnb1*, *Ccne1*, *Ccne2*), co wskazuje na zahamowanie proliferacji komórek mieloidalnych. Wśród genów o obniżonej ekspresji w grupie OAT-1746 zidentyfikowano również te, które są zaangażowane w chemotaksję limfocytów, tj. *Ccl2*, *Ccl7* i *Ccl17* oraz geny związane z migracją i inwazyjnością (*Cme1*, *S100a4* i *Mmp14*). *Ccl17* odgrywa kluczową rolę w rekrutacji komórek T regulatorowych do tkanek dotkniętych stanem zapalnym lub nowotworem (Hirata i wsp., 2019). Ponadto geny kodujące białka zaangażowane w hamowanie odpowiedzi odpornościowej, takie jak: ApoE – marker

m.in. fenotypu przeciwzapalnego GAMs (Baitsch i wsp., 2011), CD69 – negatywny regulator odpowiedzi odpornościowej (Mita i wsp., 2018) i Cxcr4 – receptor dla immunosupresyjnej chemokiny Cxcl12, miały obniżoną ekspresję po zastosowaniu OAT-1746 lub kombinacji OAT-1746+anty-PD-1 (**Rycina 9D**).



Rycina 9. Profil transkryptomyczny komórek CD11b⁺ izolowanych z mózgów myszy z glejakiem po podawaniu OAT-1746, anty-PD-1 Ab lub kombinacji immunomodulatorów.

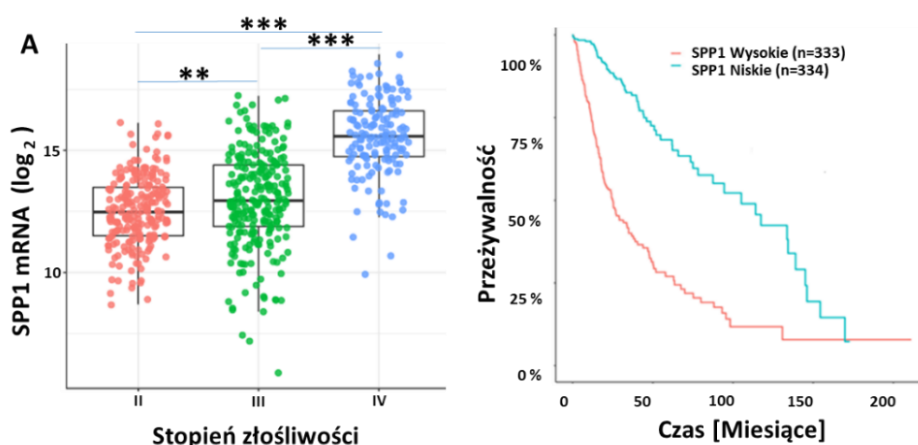
(A) Schemat doświadczenia. Profilowanie ekspresji genów przeprowadzono za pomocą sekwencjonowania RNA komórek CD11b⁺ z pólki z nowotworem ze wszystkich grup doświadczalnych w 21 dniu po implantacji. (B) Diagram Venna pokazujący liczbę genów o różnej ekspresji (DEG) między grupami doświadczalnymi a grupą kontrolną (padj<0,05). (C) Analiza wzbogacenia funkcjonalnego w procesy biologiczne wg. Gene Ontology (GO) dla genów o podwyższonej oraz obniżonej ekspresji w grupie OAT-1746 w porównaniu z kontrolą. (D) Mapy ciepła typu Z-score dla wybranych genów reprezentują zmianę w ekspresji genów w komórkach CD11b⁺ ze zwierząt po podawaniu OAT-1746, anty-PD-1 Ab lub kombinacji.

7.2. Ocena wpływu peptydu RGD na mikrośrodowisko glejaka u myszy oraz zbadanie jego przeciwnowotworowego działania w połączeniu z przeciwciałem anty-PD-1

Peptyd RGD został zaprojektowany w Pracowni Neurobiologii Molekularnej w celu blokowania wiązania pochodzących z glejaka białek SPP1 i MFGE8 do integrzyn $\alpha\beta3/\alpha\beta5$, występujących głównie na GAMs i komórkach naczyń krwionośnych w nowotworze (Ellert-Miklaszewska i wsp., 2016b). Aktywność tego peptydu potwierdzono we współhodowlach mikrogleju z glejakiem, wykazując blokowanie pronowotworowego przeprogramowania komórek mikrogleju przez czynniki wydzielane przez glejaka (Ellert-Miklaszewska i wsp., 2016a). W niniejszej rozprawie oceniono przeciwnowotworowe działanie peptydu RGD w mysim modelu glejaka GL261.

7.2.1. Analiza ekspresji *SPP1* w próbkach ludzkich glejaków

Korzystając z danych transkryptomicznych z TCGA zbadano poziom ekspresji *SPP1* w ludzkich glejakach o różnym stopniu złośliwości: G2, G3, G4 według WHO. Najwyższy poziom mRNA *SPP1* stwierdzono w glejakach złośliwych G4 (**Rycina 10A**). Analiza zależności przeżycia pacjentów od poziomu ekspresji genu wykazała, że wysoki poziom *SPP1* koreluje ze złym rokowaniem u pacjentów z GBM (**Rycina 10B**). Dane te wskazują, że *SPP1* jest ważnym celem terapeutycznym w glejakach.

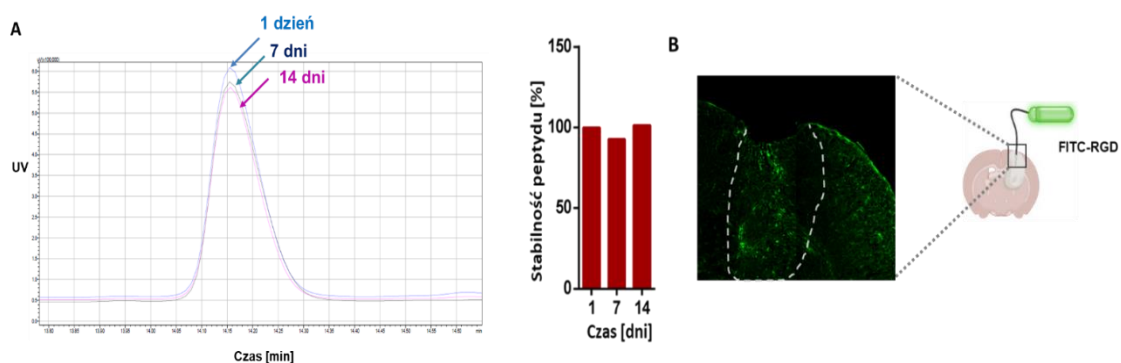


Rycina 10. Ekspresja *SPP1* w próbkach ludzkich glejaków z TCGA. (A) Ekspresja *SPP1* w glejakach o różnym stopniu złośliwości (G2-4 wg. WHO) w zbiorach danych TCGA. Istotność statystyczna została określona za pomocą testu Honest Significant Difference (HSD) Tukeya; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. (B) Krzywa przeżycia (Kapłana-Meiera) pacjentów z GBM wygenerowane przy użyciu portalu GlioVis.

7.2.2. Ocena stabilności peptydu RGD w pompie osmotycznej oraz jego biodystrybucji po podaniu doguzowym

Przed przystąpieniem do oceny aktywności peptydu RGD w modelu glejaka u myszy, sprawdzono jego stabilność w pompie osmotycznej, której planowano używać do doguzowego podawania peptydu. Oceniono także efektywność rozchodzenia się peptydu podanego tą drogą w tkance mózgu. Peptyd RGD rozpuszczono w wodzie w stężeniu 2 mg/ml i inkubowano w pompie osmotycznej przez 1, 7 i 14 dni w temperaturze 37°C. Analiza peptydu RGD inkubowanego w pompie osmotycznej metodą HPLC połączoną ze spektrometrią mas nie wykazała obecności żadnych produktów degradacji ani spadku poziomu peptydu podczas inkubacji (**Rycina 11A**). Dane te potwierdzają stabilność peptydu RGD w roztworze wodnym oraz brak wiązania peptydu do pompy osmotycznej.

Następnie przeanalizowano biodystrybucję peptydu RGD znakowanego FITC, który podawano do mózgów myszy z glejakiem GL261 za pomocą pompy osmotycznej przez 14 dni. Analiza skrawków mózgu wykazała, że peptyd RGD był obecny w rdzeniu guza oraz w otaczających guz obszarach, co wskazuje na skuteczne dostarczanie peptydu i jego penetrację w głąb tkanki (**Rycina 11B**).

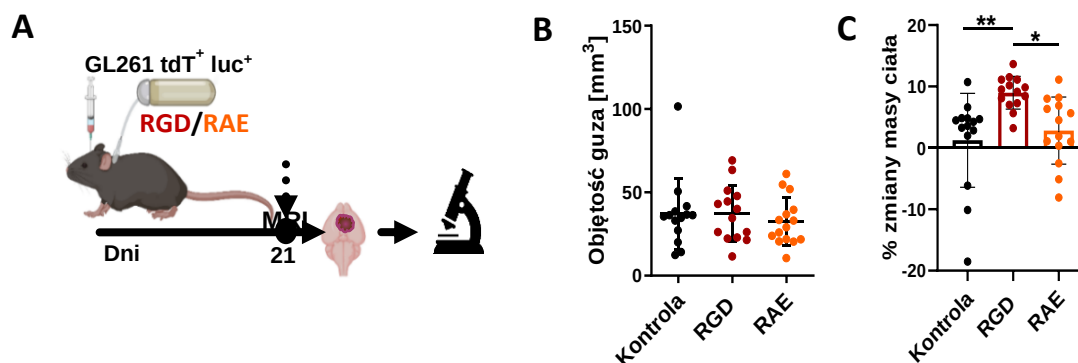


Rycina 11. Stabilność peptydu RGD w pompie osmotycznej oraz jego biodystrybucja w tkance mózgu.

(A) Stabilność peptydu RGD rozpuszczonego w wodzie i inkubowanego w pompach osmotycznych przez 1, 7 i 14 dni w temperaturze 37°C analizowano za pomocą HPLC połączonej ze spektrometrią mas. **(B)** Biodystrybucja peptydu RGD znakowanego FITC (zielony) podawanego do guza przez 14 dni za pomocą pomp osmotycznych, myszom z glejakiem GL261. Reprezentatywny obraz przekroju mózgu z obszarem guza zaznaczonym przerywaną linią.

7.2.3. Wpływ peptydu RGD na wielkość guza oraz wagę zwierząt

Ocenę aktywności peptydu RGD *in vivo* przeprowadzono badając jego wpływ na wzrost mysiego glejaka. Komórki GL261 tdT⁺ luc⁺ zaimplantowano do prążkowania mózgu immunokompetentnych myszy C57BL/6J. W badaniach, oprócz peptydu RGD, zastosowano peptyd kontrolny, RAE, który miał taki sam skład aminokwasowy poza podmianą reszty kwasu asparaginowego (D) na resztę kwasu glutaminowego (E) w kluczowym dla wiązania integrzyn motywie RGD (arginina-glutamina-kwas asparaginowy). Peptyd podawano doguzowo za pomocą mikropomp osmotycznych, które instalowano w momencie implantacji komórek glejaka. Roztwory były dostarczane z pompy w sposób ciągły, z kontrolowaną szybkością ze względu na różnicę ciśnień osmotycznych pomiędzy pompą a otoczeniem (Gaisford 2012). Myszy z glejakiem otrzymywały roztwór wodny jednego z peptydów: RGD lub RAE grupa kontrolna dostawała wodę przez cały czas trwania doświadczenia (Schemat **12A**). Wielkość guzów zbadano za pomocą rezonansu magnetycznego 21 dnia po implantacji. Stwierdzono brak wpływu peptydów na wzrost guza w porównaniu z grupą kontrolną (**Rycina 12B**). Jednakże waga myszy, którym podawano peptyd RGD, znacząco wzrosła, podczas gdy zwierzęta otrzymujące wodę lub RAE straciły na wadze lub ich waga pozostała niezmienną (**Rycina 12C**). Przyrost masy ciała jest jednym ze wskaźników dobrostanu zwierząt w doświadczalnych modelach nowotworów.



Rycina 12. Ocena wpływu peptydu RGD na wielkość guza oraz wagę zwierząt.

(A) Schemat doświadczenia. Myszy z zaimplantowanymi komórkami glejaka GL261 tdT⁺ luc⁺ otrzymywały za pomocą pomp osmotycznych: wodę, peptyd kontrolny (RAE) lub peptyd RGD. (B) Objętość guzów mierzona za pomocą rezonansu magnetycznego (MRI) w 21 dniu po implantacji. N=15-16 na grupę. (C) Porównanie masy ciała myszy między dniem 0 (dzień implantacji) a dniem 21 po implantacji w grupie kontrolnej oraz w grupach otrzymujących peptydy.

7.2.4. Wpływ peptydu RGD na profil transkryptomiczny komórek CD11b⁺

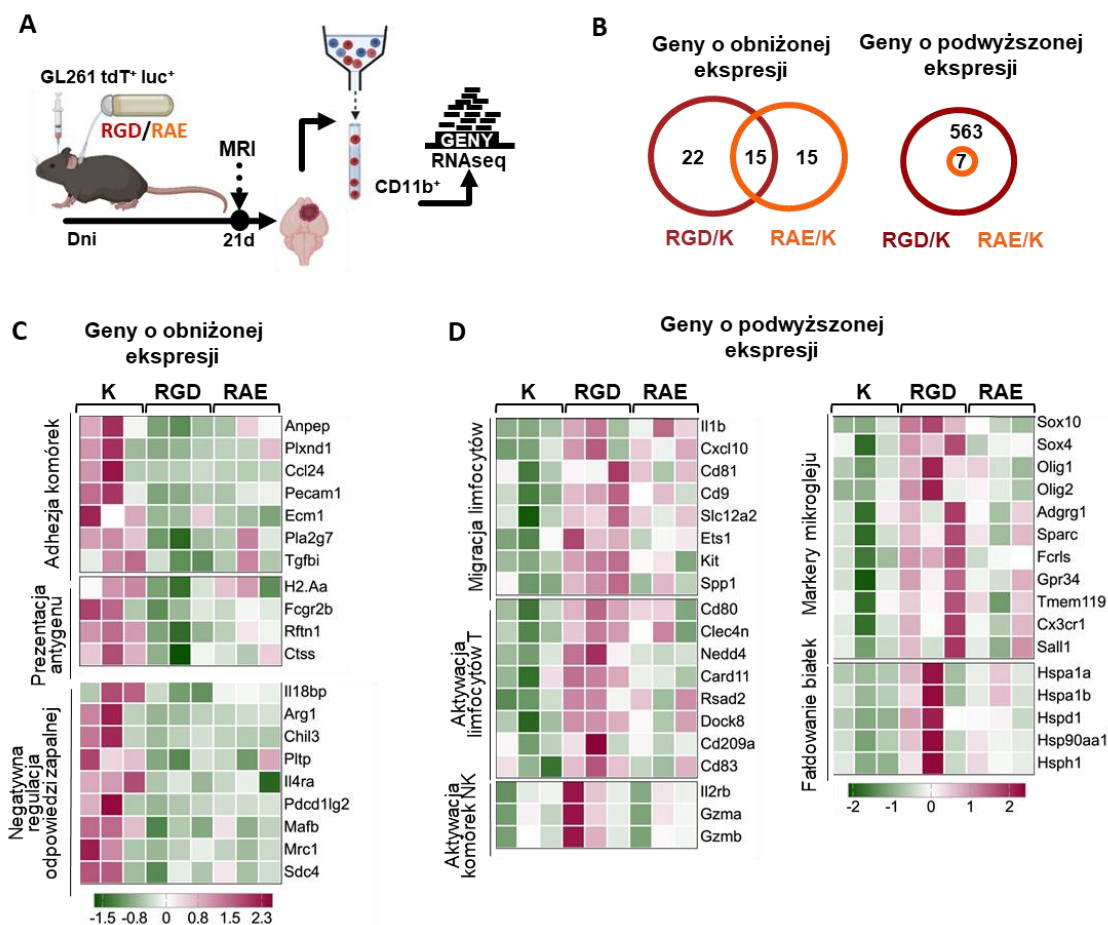
Aby uzyskać więcej informacji na temat mechanizmu działania peptydu RGD na mikrośrodowisko nowotworu, porównano profile transkryptomiczne komórek mieloidalnych CD11b⁺, które wyizolowano z półkul mózgów z guzem (**Rycina 13A**) pobranych od myszy ze wszystkich grup doświadczalnych opisanych w punkcie 7.2.3. **Rycina 13B** pokazuje diagramy Venna przedstawiające liczbę genów, których ekspresja uległa zmianie w komórkach CD11b⁺ z glejaków u myszy, którym podawano RGD lub RAE w porównaniu z grupą kontrolną. Z 563 genów o podwyższonej ekspresji w wyniku podawania RGD, tylko siedem zidentyfikowano jako geny o znamiennej wyższej ekspresji w komórkach CD11b⁺ u myszy w grupie RAE, co potwierdza specyficzność odpowiedzi na peptyd RGD.

Aby sklasyfikować geny o zmienionej ekspresji do grup funkcjonalnych, przeprowadzono analizę wzbogacenia używając definicji Gene Ontology (GO: Biological Process), osobno na genach o obniżonej oraz podwyższonej ekspresji. Geny o obniżonej ekspresji w grupie RGD (**Rycina 13C**) były związane z adhezją komórek, przetwarzaniem i prezentacją antygeny, negatywną regulacją aktywacji limfocytów i negatywną regulacją procesów układu odpornościowego. Wśród genów o podwyższonej ekspresji w grupie RGD znaleziono grupy genów zaangażowanych w regulację adhezji komórek, aktywację komórek T i NK i migrację leukocytów (**Rycina 13D**). Geny

zaangażowane w adhezję leukocytów, tj. *Anpep*, promujący adhezję monocytów do śródbłonna naczyń w początkowych stadiach wyjścia leukocytów z naczyń krwionośnych do tkanek (Mina-Osorio i wsp., 2008) i *Pecam1*, członek nadrodziny immunoglobulin, zaangażowany w migrację leukocytów, angiogenezę i aktywację integryn, były obniżone po podawaniu peptydu RGD. Ekspresja genów *Arg1*, *Chil3* i *Mrc1*, kodujących białka zaangażowane w supresję odpowiedzi odpornościowej makrofagów była obniżona w komórkach CD11b⁺ w grupie myszy otrzymujących RGD. Zaobserwowano także obniżenie poziomów *Pdcd1lg2*, *Il4ra* i *Il18bp*. Wiązanie liganda programowanej śmierci komórki PD-L2 (kodowanego przez *Pdcd1lg2*) z jego receptorem PD-1 prowadzi do hamowania proliferacji komórek T i wytwarzania cytokin zapalnych. *Il4ra* koduje łańcuch alfa receptora dla interleukiny (IL)-4, który jest dobrze znany z promowania fenotypu pronowotworowego makrofagów. Podawanie RGD indukowało ekspresję genów związanych z procesem aktywacji limfocytów T. Do tej grupy zaliczał się gen kodujący cząsteczkę CD80, która dostarcza sygnał kostymulujący niezbędny do aktywacji limfocytów T oraz *Rsad2*, będący genem stymulowanym interferonem, zaangażowanym w odporność wrodzoną, niezbędnym dla aktywacji komórek dendrytycznych (DC).

Ponadto, w komórkach CD11b⁺ u myszy otrzymujących RGD stwierdzono wysoką ekspresję genów kodujących: CD81 – regulator rekrutacji komórek NK (Krämer i wsp., 2009), cytokinę IL1B i CXCL10 – chemokinę stymulowaną IFN γ , która przyciąga komórki T poprzez wiązanie się do receptora CXCR3. Geny związane z cytotoksyczną aktywnością komórek NK również uległy znacznemu podwyższeniu w izolowanych z guzów komórkach CD11b⁺ w wyniku podawania RGD. Do tej grupy zaliczały się geny kodujące: podjednostkę beta receptora interleukiny 2 (*IL2rb*) zaangażowaną w odpowiedź immunologiczną limfocytów T i komórek NK, a także granzym A (*Gzma*) i granzym B (*Gzmb*), które są głównymi czynnikami cytotoxicznymi w odpowiedzi przeciwnowotworowej cytotoxicznych komórek NK. W komórkach CD11b⁺ pochodzących od myszy otrzymujących RGD stwierdzono także wysoką ekspresję *Fcrls* i *Tmem119*, kodujących markery homeostatycznego mikrogleju. Inna ważna grupa genów o zwiększonej ekspresji obejmowała kilku członków rodziny białek szoku cieplnego, które są zaangażowane w stymulację zarówno odporności wrodzonej, jak i nabytej (Hu i wsp., 2022). Stwierdzone zmiany transkryptomiczne sugerują

przeprogramowanie komórek CD11b⁺ związanych z nowotworem po podaniu peptydu RGD.



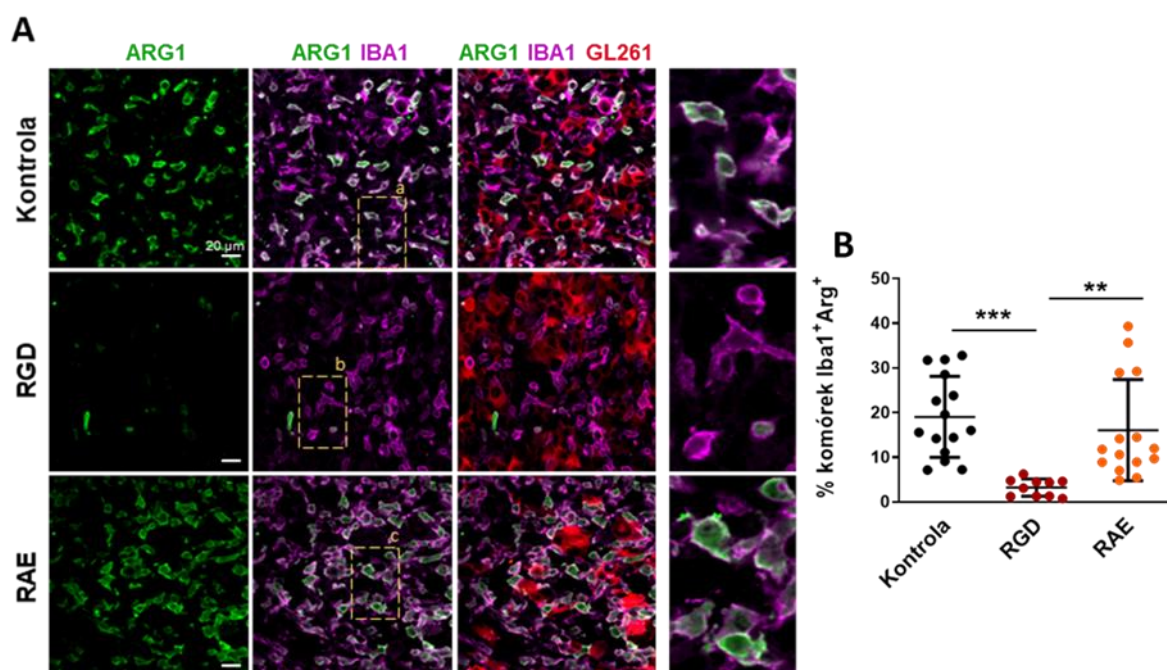
Rycina 13. Profil transkryptomyczny komórek CD11b⁺ u myszy z glejakiem po podaniu RGD.

(A) Schemat doświadczenia. Myszy z zaimplantowanymi komórkami glejaka GL261 tdT⁺ luc⁺ otrzymywały za pomocą pomp osmotycznych: wodę (K), peptyd kontrolny (RAE) lub peptyd RGD. Profilowanie ekspresji genów przeprowadzono za pomocą sekwencjonowania RNA komórek CD11b⁺ izolowanych z półkuli z guzem z mózgowi myszy w 21 dniu po implantacji. (B) Diagram Venna pokazujący liczbę genów o statystycznie znaczącej różnicy w ekspresji (DEG, ang. differentially expressed genes) między RGD i RAE w porównaniu z grupą kontrolną, zarówno dla genów o obniżonej, jak i podwyższonej ekspresji. (C-D) Mapy ciepła w wariancie z-score dla wybranych genów przedstawiają względną zmianę w ekspresji genów w komórkach CD11b⁺ od zwierząt otrzymujących RGD i RAE dla genów o (C) obniżonej oraz (D) podwyższonej ekspresji.

7.2.5. Ilościowa ocena komórek Arg1⁺ w mikrośrodku glejaka

W celu zobrazowania GAMs w glejaku oraz scharakteryzowania fenotypu tych komórek po podawaniu peptydu RGD i w grupach kontrolnych, wykonano podwójne

barwienie immunohistochemiczne wykrywające Iba1(marker GAMs) i Arg1 (marker fenotypu immunosupresyjnego) na skrawkach mózgu myszy z glejakiem. Jak pokazano na reprezentatywnych zdjęciach (**Rycina 14A**), podawanie RGD znacząco zmniejszyło odsetek komórek podwójnie dodatnich Iba1⁺ + Arg1⁺ w porównaniu z grupami otrzymującymi peptyd kontrolny (RAE) lub wodę (**Rycina 14B**). Dane te potwierdziły obserwacje z analizy RNAseq. Mimo iż podawanie RGD nie skutkowało zmianą wielkości guza, prowadziło do ograniczenia nagromadzenia w mikrośrodku nowotworu mikrogleju/makrofagów o proinwazyjnym fenotypie.



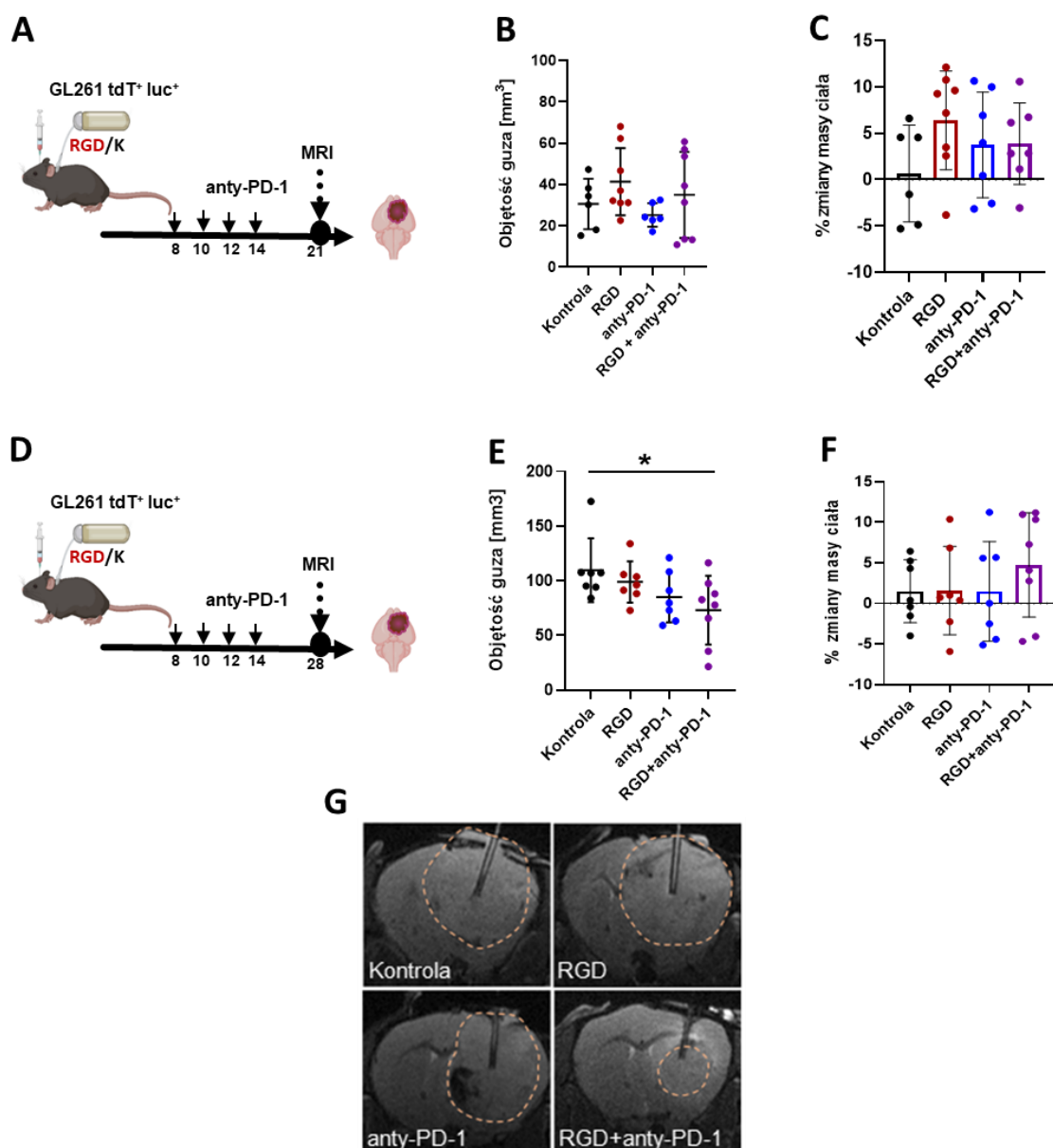
Rycina 14. Ocena ilościowa obecnych w guzie komórek Iba1⁺ o profilu pronowotworowym po podaniu peptydów.

(A) Reprezentatywne obrazy skrawków mózgu (w dniu 21 po implantacji) barwionych przeciwciałami anti-Iba1 (na różowo) i anti-Arg1 (na zielono). (B) Odsetek komórek Iba1⁺ + Arg1⁺ w polu widzenia. Komórki zliczono za pomocą oprogramowania ImageJ i przedstawiono średnie wartości z 3 skrawków/zwierzę; n=5. Istotność statystyczną różnic pomiędzy grupami obliczono za pomocą jednoczynnikowej analizy ANOVA z testem post-hoc Tukeya dla wielokrotnych porównań.

7.2.6. Wpływ podawania peptydu RGD z przeciwciałem anti-PD-1 na wielkość guza oraz wagę zwierząt

Ograniczona skuteczność inhibitorów immunologicznych punktów kontrolnych w GBM wynika głównie z immunosupresyjnego mikrośrodowiska guza, które upośledza prawidłowe funkcjonowanie limfocytów T. Podawanie RGD doprowadziło do ograniczenia odsetka komórek GAM o fenotypie immunosupresyjnym, mimo braku wpływu na wielkość guza. W kolejnym doświadczeniu sprawdzono, czy podawanie RGD

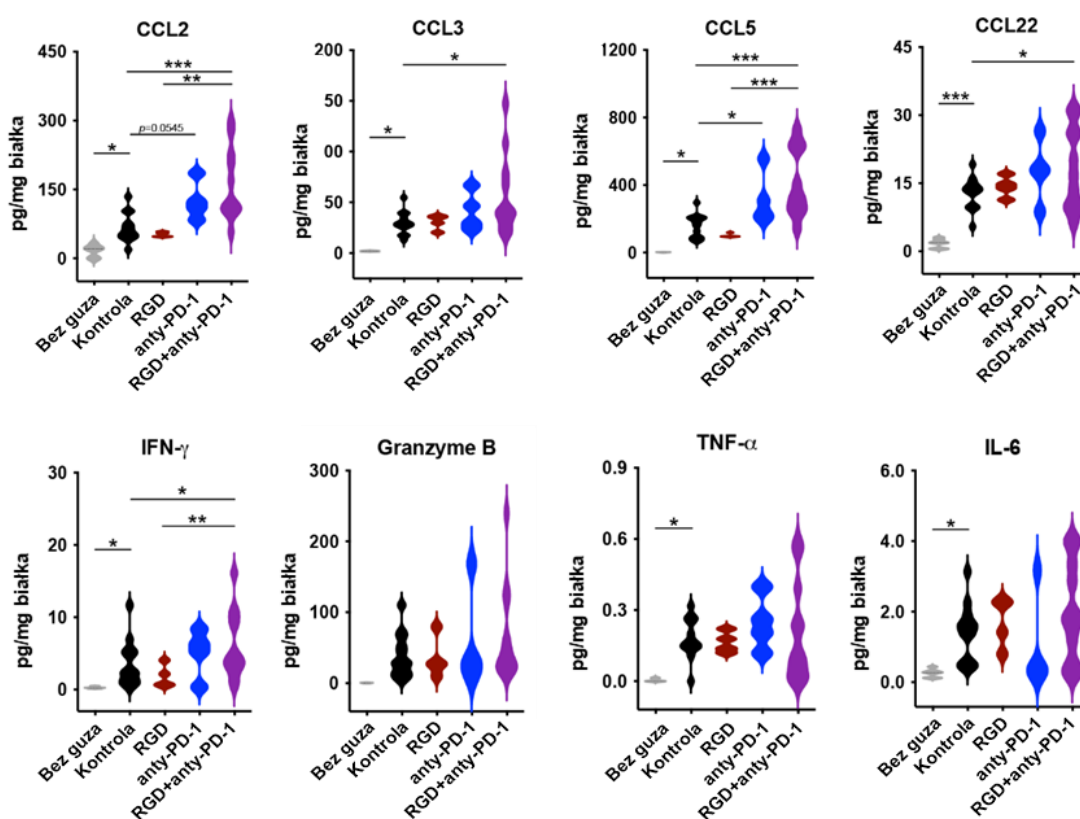
razem z anti-PD-1 Ab przywróci skuteczną odpowiedź przeciwnowotworową. Zwierzęta otrzymywały peptyd RGD za pomocą pomp osmotycznych od dnia implantacji komórek glejaka GL261 tdT⁺luc⁺ oraz przeciwciała anti-PD-1 lub kontrolne IgG dootrzewnowo, w dniach wskazanych na schemacie (**Rycina 15A i D**). Wzrost guza oceniano za pomocą MRI w 21 lub 28 dniu po implantacji komórek nowotworowych. Doguzowe podawanie peptydu RGD wraz z przeciwciałem anti-PD-1 nie wykazało żadnego wpływu na wielkość guza badaną w dniu 21, jednak w dniu 28 guzy były znacząco mniejsze w porównaniu z grupą kontrolną (Kontrola vs. RGD+anti-PD-1 Ab: $p = 0,0128$, $r = 0,67$) (**Rycina 15B i E**). Rycina 15G przedstawia reprezentatywne zdjęcia wielkości guza w różnych grupach w 28 dniu po implantacji komórek glejaka. Analiza zmiany masy ciała myszy w 21 dniu po implantacji względem wagi początkowej wskazywała, że stan zwierząt w grupach otrzymujących immunomodulatory był lepszy niż myszy z grupy kontrolnej, chociaż różnice te nie były istotne statystycznie (**Rycina 15C**). W 28 dniu po implantacji komórek glejaka średnia zmiana masy ciała u zwierząt otrzymujących RGD lub anti-PD-1 Ab była podobna jak w grupie kontrolnej. Natomiast wśród myszy, które otrzymały kombinację obu immunomodulatorów, większość zwierząt z czasem przybrała na wadze (**Rycina 15F**).



Rycina 15. Ocena wpływu RGD w kombinacji z anti-PD1 Ab na wielkość guza oraz wagę zwierząt. (A i D) Schematy doświadczeń. Mysiom wszczepiono komórki glejaka GL261 tdT⁺ luc⁺, a następnie podawano wodę (kontrola) lub peptyd RGD przez pompy osmotyczne i przeciwciało anti-PD-1 (10 mg/kg) lub kontrolne IgG dootrzewnowo w 8, 10, 12 i 14 dniu po implantacji. **(B i E)** Objętość guza mierzona za pomocą rezonansu magnetycznego (MRI) w 21 lub 28 dni po implantacji. Wpływ immunomodulatorów oceniano za pomocą wzoru: $\text{effect size} = \sqrt{(F_{\text{contrast}} / (F_{\text{total}} * (df_{\text{between}} + df_{\text{within}})))}$, gdzie $F_{\text{contrast}} = t^2$ (z Sidak's multiple comparison test; test details); $F = F$ ogólny z ANOVA; $df_{\text{between}} = k - 1$, gdzie k to liczba grup; $df_{\text{within}} = n - 2$ (N = liczba zwierząt w obu grupach). Dane z 28 dnia po implantacji: Kontrola versus RGD + anti-PD-1 Ab = 0,67. Istotność statystyczną różnic pomiędzy grupami analizowano za pomocą jednoczynnikowej analizy ANOVA z testem post-hoc Sidaka dla wielokrotnych porównań: $p = \text{Kontrola versus RGD + anti-PD-1} = 0,0128$, $N = 6-8$ **(C i F)** Porównanie zmian masy ciała u myszy pomiędzy dniem 0 (dzień implantacji) a dniem 21 lub 28 po implantacji; $N = 6-8$; **(G)** Reprezentatywne zdjęcia MRI z każdej grupy zwierząt w 27 dniu po implantacji komórek glejaka. Granice guza oznaczono przerywaną linią.

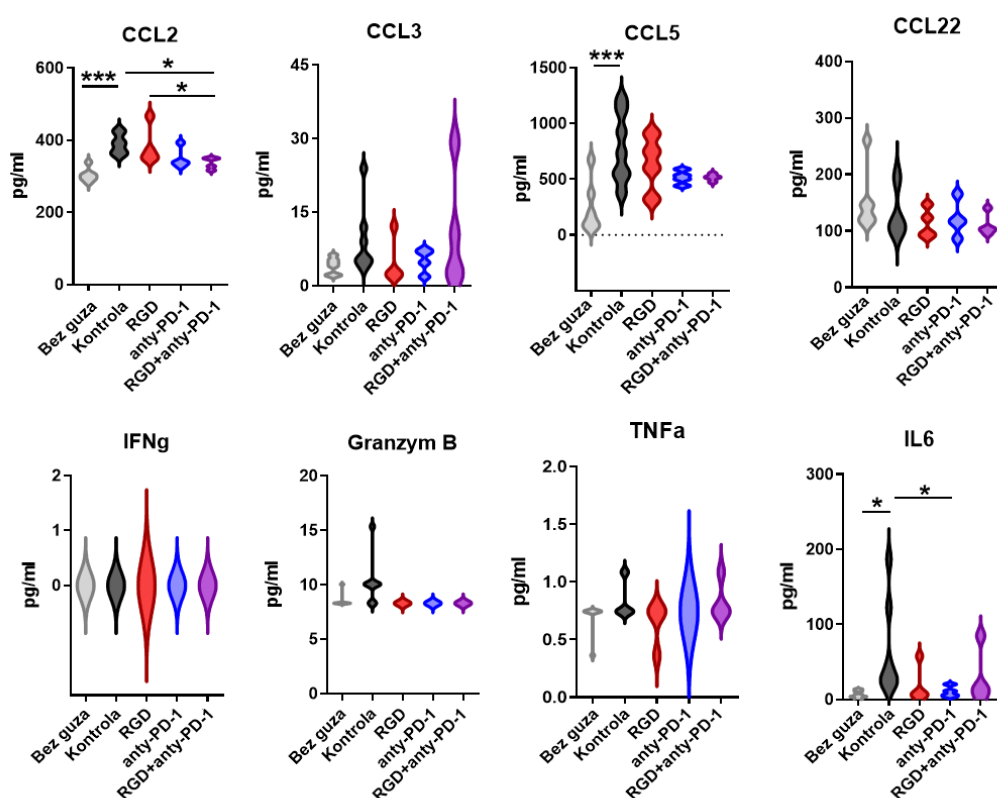
7.2.7. Ocena poziomu cytokin pro- i przeciwzapalnych po podaniu RGD oraz anty-PD-1 Ab

Poziomy cytokin pro- i przeciwzapalnych zmierzono w homogenatach mózgu i surowicach myszy bez guza oraz zwierząt z glejakiem we wszystkich grupach doświadczalnych po 28 dniach od implantacji komórek glejaka. Poziomy wszystkich cytokin w mózgach i surowicy były wyższe u zwierząt z glejakiem niż u myszy bez guza. Poziomy CCL5, CCL2, CCL22 i CCL3 w homogenatach mózgów zwierząt otrzymujących anty-PD-1 Ab były podwyższone, a efekt ten był jeszcze większy u zwierząt, którym podawano RGD+anty-PD-1 Ab. Poziomy IFN γ , granzymu B i TNF α w guzie również wykazały pewną tendencję wzrostową po podawaniu anty-PD-1 oraz kombinacji w porównaniu z grupą kontrolną. Przy czym poziom IFN γ był znacząco wyższy w grupie RGD+anty-PD-1 Ab w porównaniu z grupą kontrolną oraz grupą otrzymującą sam peptyd (**Rycina 16**).



Rycina 16. Poziom cytokin pro- i przeciwzapalnych w homogenatach mózgu. Poziomy cytokin pro/przeciwzapalnych oznaczono w homogenatach mózgu myszy zdrowych (bez guza) i zwierząt ze wszystkich grup doświadczalnych w 28 dniu po implantacji komórek glejaka, stosując test ELISA oparty na kulkach Luminex. Wykresy skrzypcowe przedstawiają poziomy badanych cytokin w pg/mg białka całkowitego. Istotność oceniano za pomocą jednoczynnikowej analizy ANOVA i nieskorygowanego testu wielokrotnych porównań LSD Fishera; N=4-12; ***p < 0,001; **p < 0,01; *p < 0,05

Co ciekawe, poziomy cytokin mierzone w surowicy tych samych zwierząt pozostały niezmienione lub wykazywały tendencję do zmniejszania się po podaniu immunomodulatorów (**Rycina 17**). CCL2 i CCL5 to główne chemokiny biorące udział w migracji monocytów do guza (Kumar i wsp., 2016). CCL3 jest uważany za marker prozapalnych makrofagów i w mikrośrodowisku nowotworu prowadzi do zmniejszenia wzrostu guza poprzez poprawę odpowiedzi komórek dendrytycznych oraz komórek T (Allen i wsp., 2018).



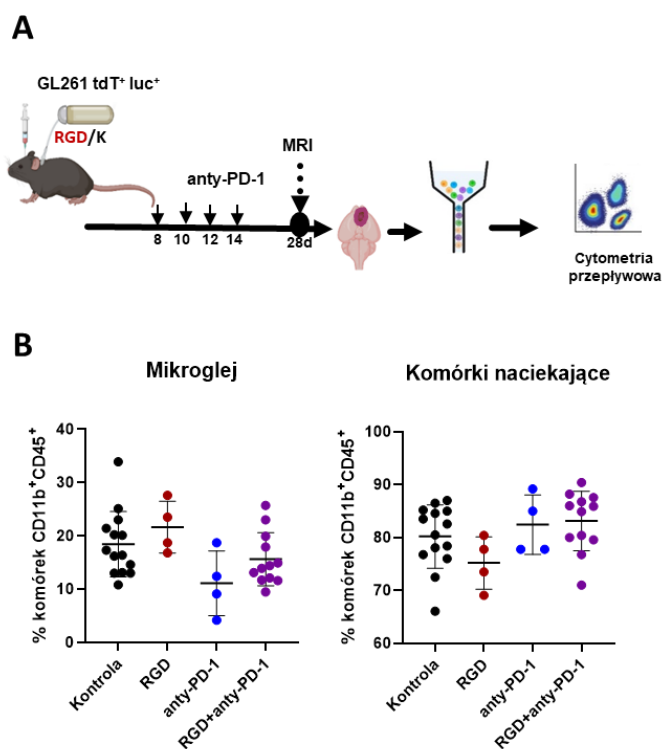
Rycina 17. Poziomy cytokin pro- i przeciwzapalnych w surowicy myszy.

Poziomy cytokin pro/przeciwzapalnych oznaczono w surowicach myszy zdrowych (bez guza) i zwierząt z grup doświadczalnych w 28 dniu po implantacji komórek glejaka, stosując test ELISA oparty na kulkach Luminex. Wykresy skrzypcowe przedstawiają poziomy badanych cytokin w pg/ml. Istotność oceniano za pomocą jednoczynnikowej analizy ANOVA i nieskorygowanego testu wielokrotnych porównań LSD Fishera; N=4-12; ***p < 0,001; **p < 0,01; *p < 0,05.

7.2.8. Ocena wpływu podawania peptydu RGD z przeciwciałem anty-PD-1 na profil komórek układu odpornościowego w mikrośrodowisku glejaka

Aby zbadać wpływ podawania RGD oraz anty-PD-1 na komórki układu odpornościowego mikrośrodowiska glejaka, przeprowadzono analizę populacji komórek linii mieloidalnej i limfoidalnej naciekających nowotwór z wykorzystaniem cytometrii przepływowej (**Rycina 18A**). W 28 dniu po implantacji nie stwierdzono różnic

ilościowych pomiędzy grupami doświadczalnymi w odsetku mikrogleju ($CD11b^+CD45^{\text{niski}}$) ani odsetku naciekających komórek mieloidalnych pochodzących ze szpiku ($CD11b^+CD45^{\text{wysoki}}$) w mózgach myszy z guzem (**Rycina 18B**).

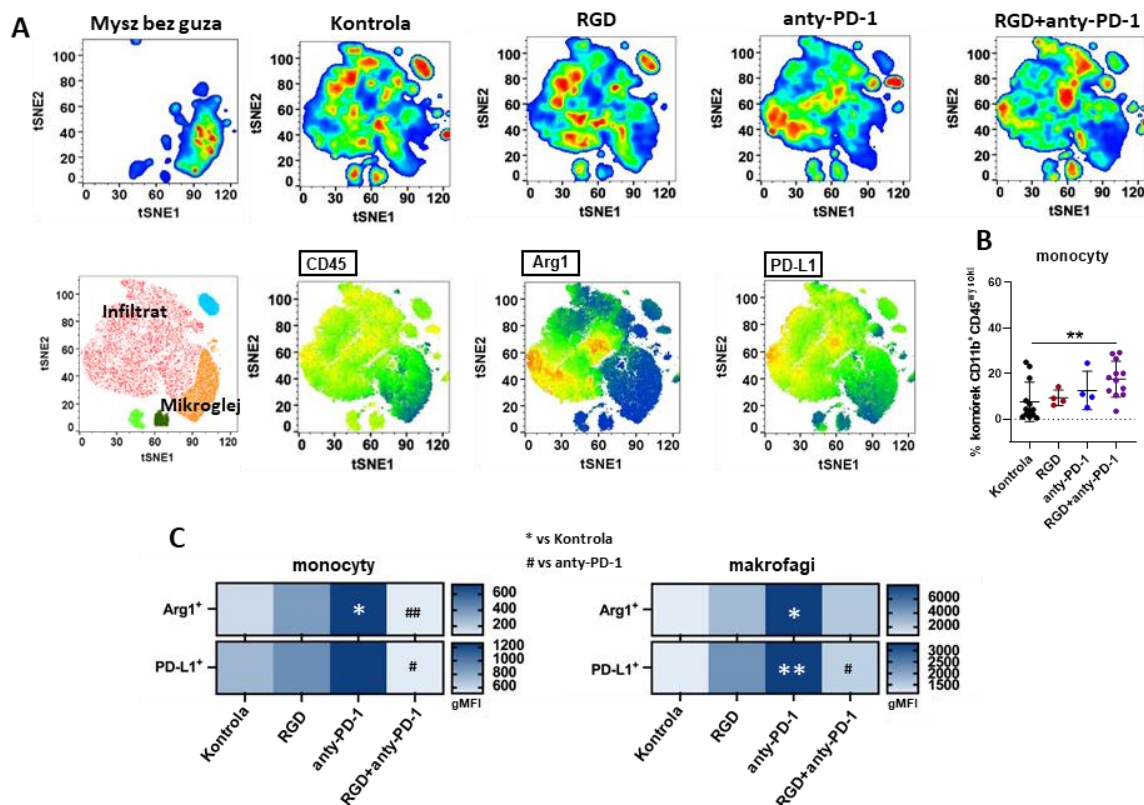


Rycina 18. Charakterystyka mikrośrodowiska glejaków po podawaniu RGD i/lub przeciwciała anti-PD-1.

(A) Schemat doświadczenia. Mysiom wszczepiono komórki glejaka GL261 tdT⁺ luc⁺, a następnie podawano wodę (kontrola) lub peptyd RGD przez pompy osmotyczne i przeciwciało anti-PD-1 (10 mg/kg) lub kontrolę izotypową IgG dootrzewnowo w 8, 10, 12 i 14 dniu od implantacji. W 28 dniu po implantacji zwierzęta poddano perfuzji PBS-em, mózgi poddano dysocjacji i przeprowadzono immunofenotypowanie w celu oceny komórek linii mieloidalnej i limfoidalnej metodą cytometrii przepływowej. (B) Odsetek populacji komórek mieloidalnych w mózgu: mikrogleju ($CD11b^+CD45^{\text{niski}}$) i naciekających komórek linii mieloidalnej pochodzących ze szpiku ($CD11b^+CD45^{\text{niski}}$).

Tym niemniej, wizualizacje t-SNE danych cytometrycznych i dalsze bardziej szczegółowe analizy z wykorzystaniem dodatkowych markerów powierzchniowych odzwierciedliły wyraźne zmiany proporcji populacji i fenotypu komórek układu odpornościowego w guzie po podawaniu immunomodulatorów (**Rycina 19A**). Co ciekawe, w populacji $CD11b^+CD45^{\text{wysoki}}$ stwierdzono znaczny wzrost liczby monocytów ($Ly6C^{\text{wysoki}}F4/80^{\text{niski}}$) (**Rycina 19B**). Komórki linii mieloidalnej pochodzące z obwodu w znacznym stopniu przyczyniają się do tworzenia immunosupresyjnego mikrośrodowiska w GBM. Dlatego oceniono, czy poziomy markerów związanych z fenotypem wspierającym nowotwór, takich jak Arg1 i PD-L1 (Pyonteck i wsp., 2013)

uległy zmianie w monocytach i makrofagach izolowanych z guzów myszy po podawaniu immunomodulatorów. Analiza wykazała, że podawanie anti-PD-1 Ab doprowadziło do zwiększenia poziomów Arg1 i PD-L1 w obu populacjach komórek linii mieloidalnej, podczas gdy podawanie RGD+anti-PD1 Ab spowodowało obniżenie poziomu Arg1 i PD-L1 zarówno w monocytach ($\text{Ly6C}^{\text{wysoki}}\text{F4/80}^{\text{niski}}$), jak i makrofagach ($\text{Ly6C}^{\text{niski}}\text{F4/80}^{\text{wysoki}}$) (Rycina 19C).

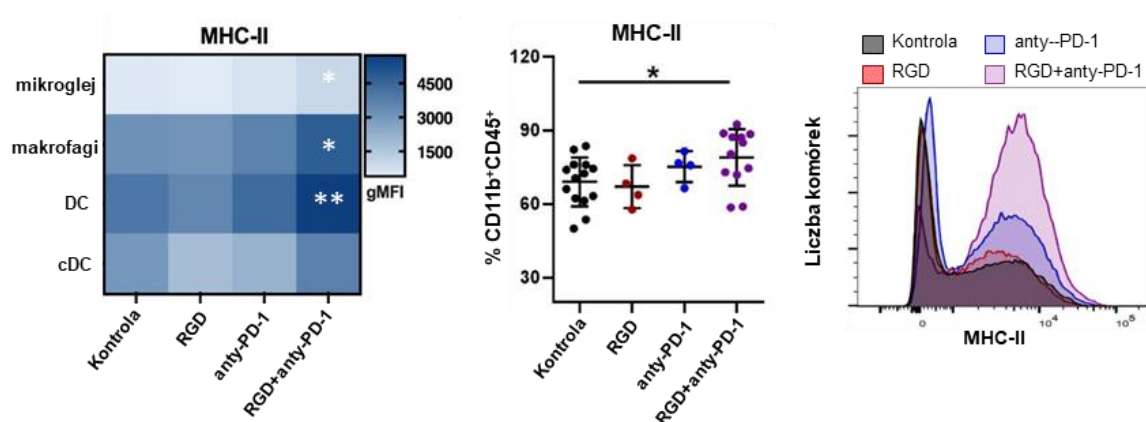


Rycina 19. Charakterystyka komórek linii mieloidalnej w glejaka po podawaniu RGD, anti-PD1 Ab lub RGD+anti-PD-1.

(A) Analiza i grupowanie t-SNE komórek $\text{CD11b}^+\text{CD45}^+$ z mózgu myszy bez guza, z guzem po podaniu wody (Kontrola) lub po podaniu immunomodulatorów. Mikroglej i naciekające komórki linii mieloidalnej ze szpiku oddzielono za pomocą bramkowania w oparciu o poziom CD45. Wykresy gęstości (górny panel) przedstawiają skupiska komórek o dużej gęstości na czerwono i obszary o małej gęstości na niebiesko. Wykresy mapy cieplnej (środkowy panel) odzwierciedlają poziomy markerów funkcjonalnych w skali od niebieskiego do czerwonego. (B) Odsetek monocytów ($\text{CD11b}^+\text{CD45}^{\text{wysoki}}\text{Ly6C}^{\text{wysoki}}\text{F4/80}^{\text{niski}}$) wyizolowanych z mózgu myszy z nowotworem we wszystkich grupach doświadczalnych. (C) Mapy ciepła pokazują poziom Arg1 i PD-L1 (w postaci średniej intensywności fluorescencji, gMFI) w monocytach ($\text{CD11b}^+\text{CD45}^{\text{wysoki}}\text{Ly6C}^{\text{wysoki}}\text{F4/80}^{\text{niski}}$) i makrofagach ($\text{CD11b}^+\text{CD45}^{\text{wysoki}}\text{CD11b}^+\text{Ly6C}^{\text{niski}}\text{F4/80}^{\text{wysoki}}$) związanych z glejakiem; N=4-14

Dodatkowo zaobserwowano zwiększony poziom cząsteczek głównego kompleksu zgodności tkankowej (MHC)-II na powierzchni mikrogleju, makrofagów i subpopulacji komórek dendrytycznych (DC) izolowanych z guzów po 28 dniach podawania

RGD+anty-PD-1 w porównaniu do grupy kontrolnej (**Rycina 20**). Poziom MHC-II odzwierciedla zdolność prezentacji antygenów i aktywacji limfocytów T CD8⁺.

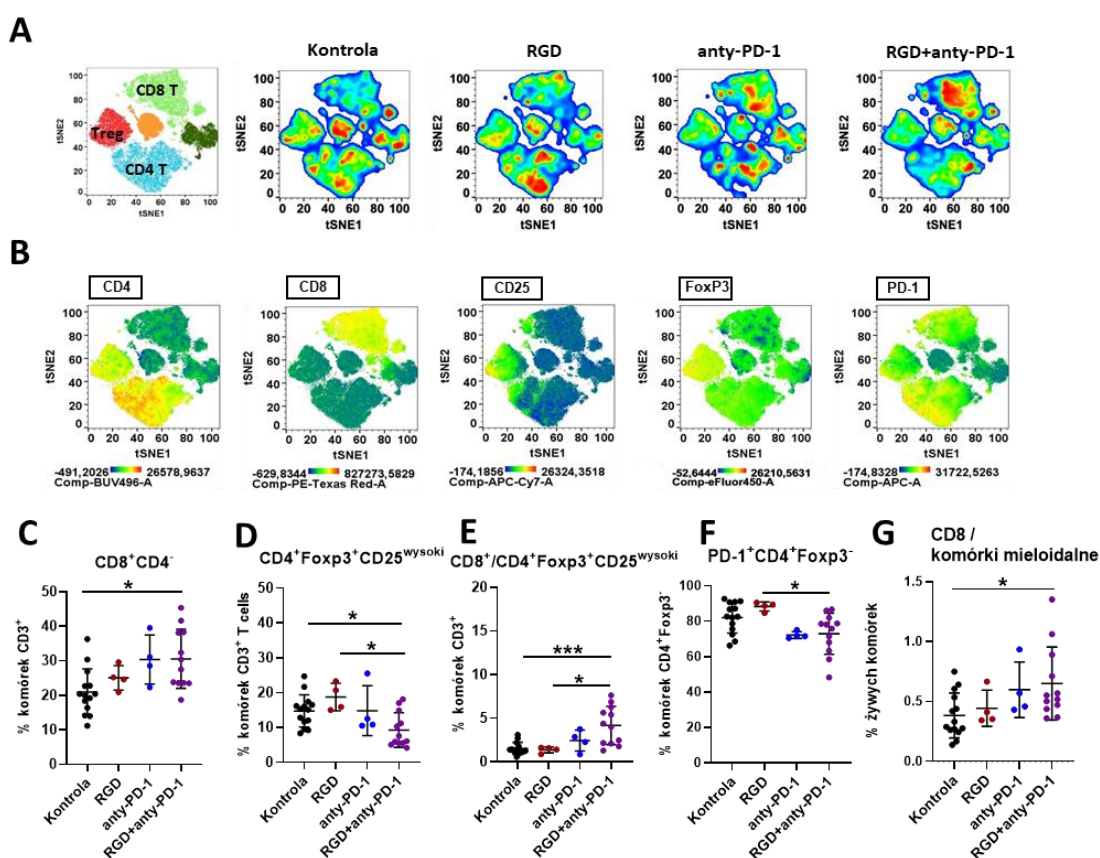


Rycina 20. Poziom cząsteczek MHC-II na powierzchni wybranych komórek linii mieloidalnej izolowanych z guzów.

Poziomy cząsteczek MHC-II (w postaci średniej intensywności fluorescencji, gMFI) w mikrogleju (CD11b⁺CD45^{niski}), makrofagach (CD11b⁺CD45^{wysoki}Ly6C^{niski}F4/80^{wysoki}), klasycznych komórkach dendrytycznych (cDC; CD11b⁺CD45^{wysoki}CD11c⁺) i innych subpopulacjach DC (różne DC; CD11b⁺CD45^{wysoki}CD11c⁺) określono za pomocą cytometrii przepływowej. Komórki izolowano z półkuli z guzem w dniu 28 po implantacji komórek glejaka, z myszy z różnych grup doświadczalnych. Histogram po prawej stronie przedstawia rozkład poziomu MHC-II w komórkach linii mieloidalnej dla reprezentatywnych zwierząt z każdej grupy.

U tych samych zwierząt, zgodnie ze schematem doświadczenia przedstawionym na Rycinie 18A, w dniu 28 po implantacji komórek glejaka zbadano także wpływ RGD, anty-PD-1 Ab lub RGD z anty-PD-1 Ab na komórki linii limfoidalnej w mikrośrodkowisku nowotworu. Wizualizacje t-SNE wieloparametrowej analizy cytometrii przepływowej panelu limfoidalnego pokazały zmiany ilościowe w populacji limfocytów (**Rycina 21A i B**). Zaobserwowano zwiększony odsetek komórek T CD8⁺ u myszy otrzymujących sam RGD lub anty-PD-1 Ab i znacznie podwyższony odsetek tych komórek po podawaniu RGD z anty-PD-1 Ab (**Rycina 21C**). Cechą środowiska immunosupresyjnego w nowotworach jest również napływ limfocytów T regulatorowych oraz indukcja ekspresji specyficznego dla Tregs czynnika transkrypcyjnego Foxp3 (Wang i wsp., 2024). Po zastosowaniu kombinacji RGD+anty-PD-1 Ab dochodziło do znacznego spadku liczebności populacji CD4⁺Foxp3⁺CD25^{wysoki} (**Rycina 21D**). Stosunek odsetka limfocytów T CD8⁺/Treg, który jest czynnikiem predykcyjnym odpowiedzi na immunoterapię w mysich modelach nowotworów, wzrósł po podawaniu RGD+anty-PD-1 Ab (**Rycina 21E**). Co więcej, stosunek odsetka limfocytów T CD8⁺ do odsetka komórek CD11b⁺ był znacząco zwiększony u zwierząt z grupy RGD+anty-PD-1 Ab z powodu

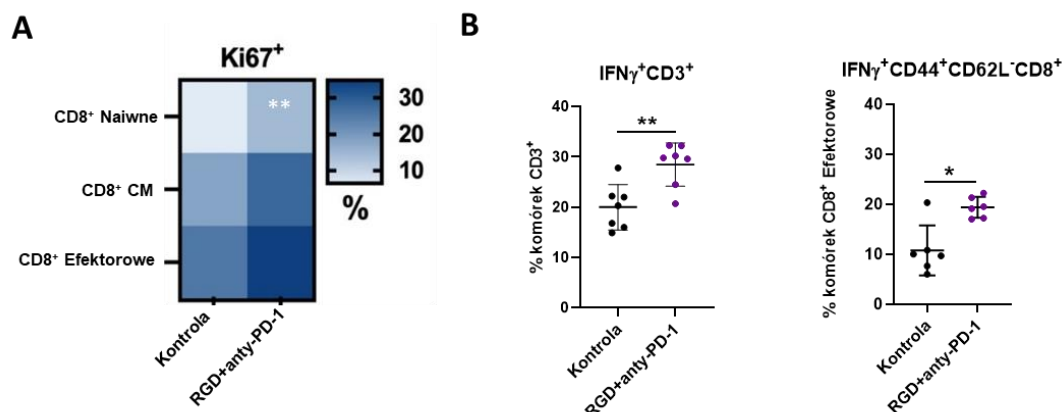
zwiększonej akumulacji limfocytów T, co wskazuje na skuteczne przeprogramowanie mikrośrodowiska glejaka (**Rycina 21G**). Biorąc pod uwagę wieloaspektową rolę limfocytów T $CD4^+$ w odpowiedzi przeciwnowotworowej, zbadano dokładniej fenotyp komórek tej populacji po podawaniu RGD+anty-PD-1 Ab. Odsetek komórek $PD-1^+CD4^+Foxp3^-$ wśród limfocytów T znacząco spadł u zwierząt z grupy RGD+anty-PD-1 Ab w porównaniu z grupą otrzymującą tylko peptyd RGD (**Rycina 21F**). Zappasodis i współautorzy wykazali, że komórki $PD-1^+CD4^+Foxp3^-$ przyczyniają się do oporności nowotworu na immunoterapię, ponieważ gromadzą się wewnątrz guza oraz ograniczają działanie komórek T efektorowych (Zappasodi i wsp., 2018).



Rycina 21. Charakterystyka komórek linii limfoidalnej w glejakach u myszy po podawaniu immunodulatorów.

(A) Analiza i grupowanie t-SNE komórek $CD45^+CD11b^-$ z mózgow myszy z guzem z różnych grup doświadczalnych (Kontrola oznacza podawanie wody zamiast RGD i kontroli izotypowej IgG dla przeciwciała anty-PD-1). Główne populacje limfocytów rozdzielono za pomocą bramkowania (pierwszy wykres od lewej) na podstawie obecności CD4, CD8 oraz FoxP3. Wykresy gęstości przedstawiają skupiska komórek o dużej gęstości na czerwono i obszary o małej gęstości na niebiesko. (B) Mapy ciepła pokazują poziomy markerów komórek i markerów funkcjonalnych w skali od niebieskiej do czerwonej (niski-wysoki). (C) Odsetek $CD8^+$ ($CD8^+CD4^+$), (D) Treg ($CD4^+Foxp3^+CD25^{wysoki}$), (E) stosunek odsetków komórek $CD8^+/Treg$, (F) odsetek komórek T $PD-1^+CD4^+Foxp3^-$ i (G) stosunek odsetków $CD8^+/CD11b^+$ wśród komórek izolowanych z mózgow myszy z nowotworem we wszystkich grupach doświadczalnych. $N=4-14$. Dane we wszystkich panelach ilościowych przedstawiają indywidualne wartości dla każdej myszy oraz średnią $\pm$ SD * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; Analiza statystyczna za pomocą testu Manna-Whitneya lub jednoczynnikowej analizy ANOVA, a następnie testu wielokrotnych porównań Tukeya.

Ponieważ znaczący wzrost odsetka limfocytów T CD8⁺ obserwowano jedynie wśród komórek izolowanych z mózgów myszy otrzymujących RGD+anty-PD-1 Ab, scharakteryzowano te komórki dokładniej jedynie w tej grupie myszy w porównaniu do grupy kontrolnej. Zbadano ekspresję Ki67 – jądrowego markera proliferujących komórek, w różnych populacjach limfocytów T CD8⁺. Na podstawie obecności powierzchniowych markerów CD44 i CD62L wśród komórek T CD8⁺ można wyróżnić: efektorowe komórki T pamięci (CD44⁺CD62L⁻), centralne komórki T pamięci (CM, CD44⁺CD62L⁺) oraz limfocyty T naiwne (lub dziewicze, CD44⁻CD62L⁺). Zaobserwowano, że podawanie RGD+anty-PD-1 Ab prowadziło do podwyższenia poziomu Ki67 wśród komórek efektorowych Tm naciekających glejaka, komórek pamięci Tcm oraz naiwnych limfocytów T CD8⁺. Wskazuje to na zwiększoną proliferację tych populacji komórek *in vivo*, przy czym statystycznie istotny wzrost w porównaniu z kontrolą wykazano jedynie dla ostatniej populacji komórek. Na mapie ciepła pokazano średnie częstości występowania komórek Ki67⁺ w różnych populacjach limfocytów T CD8⁺ po podaniu RGD+anty-PD-1 Ab (**Rycina 22A**). Dodatkowym sposobem sprawdzenia, czy w wyniku podawania myszom RGD+anty-PD-1 Ab zostają przywrócone funkcje efektorowe komórek T CD8⁺ naciekających glejaka, było oznaczenie wytwarzania IFN γ przez limfocyty T stymulowane *ex vivo*. Po rozdysocjowaniu tkanki mózgu do zawiesiny pojedynczych komórek, zawieszono je w pożywce hodowlanej i inkubowano przez 4 h z koktajlem stymulującym zawierającym PMA i jonomycynę, w obecności inhibitorów transportu białek: monenzyny i brefeldyny A. Następnie wyznakowano komórki za pomocą przeciwciał przeciwko głównym markerom powierzchniowym i przeprowadzono analizę metodą cytometrii przepływowej. Podawanie RGD+anty-PD-1 Ab znacząco zwiększyło zdolność wytwarzania IFN γ przez limfocyty T CD3⁺ i, co ważne, również przez efektorowe komórki T CD8⁺ (**Rycina 22B**). Wyniki te wskazują na przeprogramowanie mikrośrodowiska nowotworu w dniu 28 po podawaniu RGD+anty-PD-1 Ab

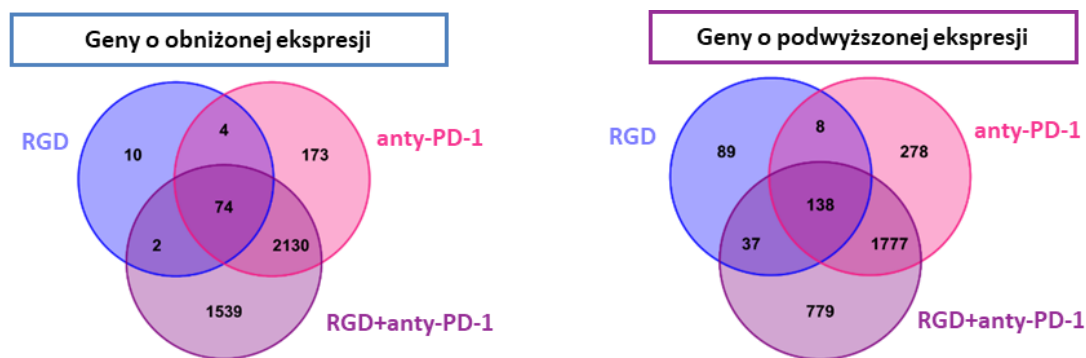


Rycina 22. Poziom Ki67 oraz IFN γ w limfocytach CD8⁺.

(A) Mapa ciepła pokazuje średni odsetek komórek Ki67⁺ wśród limfocytów T CD8⁺ efektorowych (CD44⁺CD62L⁻), pamięci centralnej (CM; CD44⁺CD62L⁺) i naiwnych (CD44⁻CD62L⁺) izolowanych z mózgów myszy z guzem z grupy kontrolnej (woda+IgG) oraz myszy otrzymujących RGD+anty-PD-1 Ab. (B) Wytwarzanie IFN γ przez komórki T naciekające glejaka (CD3⁺) i efektorowe komórki T CD8⁺ wyizolowane z mózgów myszy otrzymujących RGD+anty-PD-1 Ab oraz kontrolnych w dniu 28 po implantacji komórek glejaka, stymulowane *ex vivo* 50 ng/ml PMA + 1 μ g/ml jonomycyny w obecności inhibitorów transportu białek przez 4 h, n=6. Wykres przedstawia indywidualne wartości dla każdej myszy oraz wartość średnią $\pm$ SD dla grupy doświadczalnej. *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001; Analiza statystyczna za pomocą testu Manna-Whitneya.

7.2.9. Wpływ peptydu RGD w połączeniu z przeciwciałem anty-PD-1 na profil transkryptyczny komórek CD11b⁺

Aby zidentyfikować czynniki molekularne zaangażowane w modulację reakcji komórek mieloidalnych gromadzących się w nowotworze w odpowiedzi na podawanie immunomodulatorów porównano profile transkryptyczne komórek CD11b⁺ wyizolowanych (w 28 dniu po implantacji komórek glejaka) z półkul mózgów myszy kontrolnych (myszy z guzem, które otrzymywały wodę oraz przeciwciało izotypowe IgG) oraz myszy, którym podawano peptyd RGD lub/i przeciwciało anty-PD-1. Diagramy Venna pokazują liczbę genów o zróżnicowanej ekspresji w grupach RGD, anty-PD-1 i kombinacji RGD+anty-PD-1 Ab w porównaniu z kontrolą. Przedstawiono oddzielnie diagramy dla genów o obniżonej oraz podwyższonej ekspresji (**Rycina 23**). Wśród badanych grup doświadczalnych największy wpływ na profil ekspresji genów w komórkach CD11b⁺ miało jednoczesne podanie peptydu RGD i przeciwciała anty-PD-1.

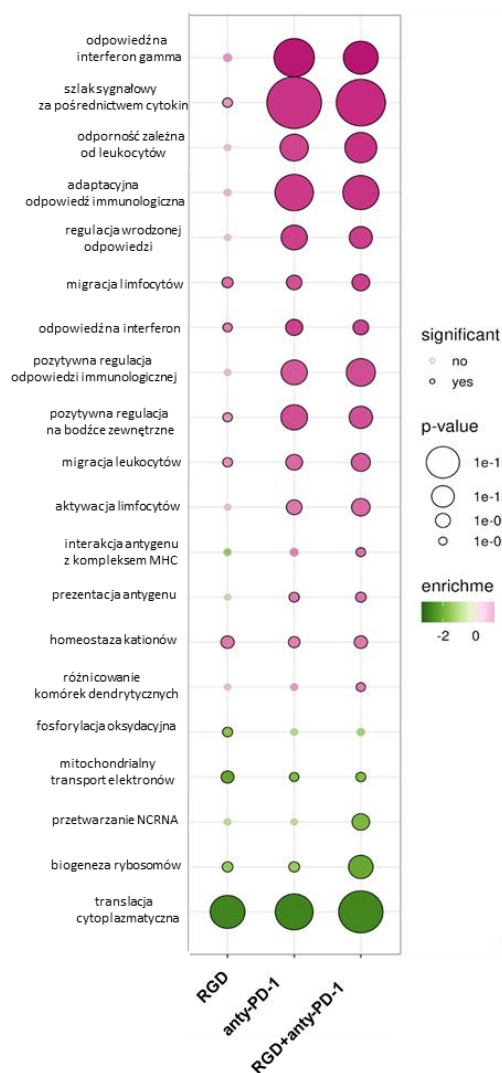


Rycina 23. Profile transkryptomiczny komórek CD11b⁺ u myszy z glejakiem w różnych grupach doświadczalnych.

Profilowanie ekspresji genów w komórkach CD11b⁺ wysortowanych z półkul mózgu myszy w 28 dniu po implantacji komórek glejaka przeprowadzono wykorzystując metodę sekwencjonowania RNA. Diagram Venna przedstawia liczbę genów o zmienionej ekspresji w komórkach CD11b⁺ z grupy zwierząt otrzymujących RGD, anti-PD-1 Ab oraz RGD+anti-PD-1 Ab w porównaniu z grupą kontrolną (zwierzęta z guzem, otrzymujące wodę+IgG), oddzielnie dla genów o obniżonej oraz podwyższonej ekspresji.

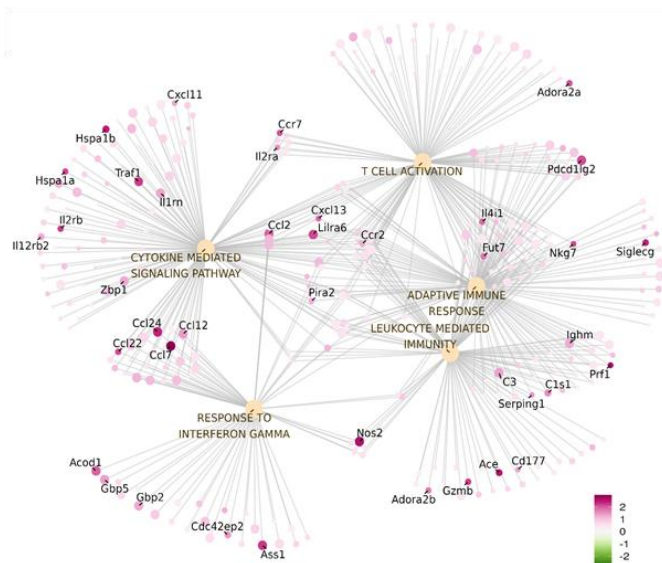
Analiza wzbogaceń z wykorzystaniem definicji Gene Ontology (GO) w zbiorze genów o podwyższonej ekspresji w grupie RGD+anti-PD-1 Ab wykazała aktywację szlaków sygnałowych związanych z odpowiedzią zapalną i przeciwnowotworową. Wśród nich wyróżniono między innymi takie szlaki jak: odpowiedź na interferon gamma, aktywacja limfocytów T, szlak sygnalizacyjny z udziałem cytokin, przetwarzanie i prezentacja antygeny. Geny o obniżonej ekspresji związane były głównie z procesami translacji i podziałami komórek (**Rycina 24A,B**). Wśród genów o obniżonej ekspresji zidentyfikowano gen *Gpnmb*, kodujący transbłonową glikoproteinę B (GPNMB), ulegający podwyższonej ekspresji w GAMs u ludzi oraz u myszy i powiązany ze złym rokowaniem u pacjenta (Szulzewsky i wsp., 2015; Walentynowicz i wsp., 2018). Makrofagi o wysokiej ekspresji GPNMB zaburzały aktywację limfocytów T przez komórki dendrytyczne (Xiong i wsp., 2022). Zaobserwowano także obniżenie poziomu genów zaangażowanych w mitochondrialny transport elektronów i fosforylację oksydacyjną, co wskazuje na zmianę metaboliczną typową dla prozapalnych komórek mieloidalnych.

A

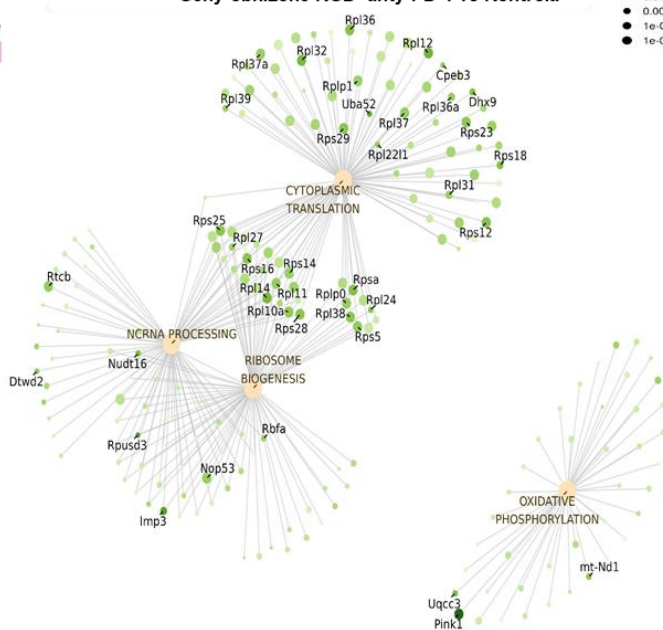


B

Geny podwyższone RGD+anty-PD-1 vs Kontrola

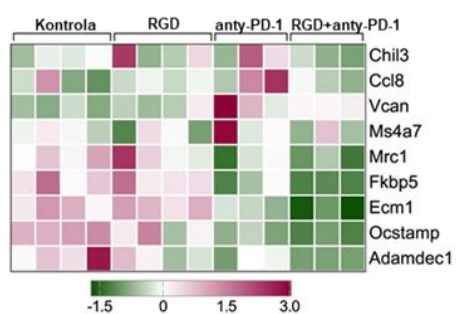


Geny obniżone RGD+anty-PD-1 vs Kontrola

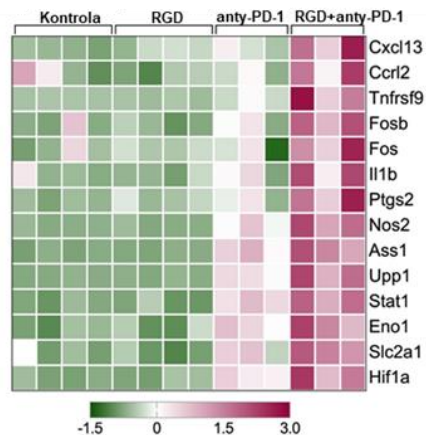


Profile transkryptomyczne w komórkach CD11b⁺ z glejaków po podawaniu anty-PD-1 Ab oraz anty-PD-1 Ab w połączeniu z RGD w dużym stopniu się pokrywały. Jednakże zaobserwowano, iż ekspresja pewnej grupy genów znacząco wzrosła po zastosowaniu RGD+anty-PD-1 Ab w porównaniu z anty-PD-1 Ab (**Rycina 25**). Wśród genów o podwyższonej ekspresji w komórkach CD11b⁺ u myszy otrzymujących RGD+anty-PD-1 Ab zidentyfikowano m.in.: *Ptgs2*, *Nos2*, *Ass1*, *Il1b* (geny kodujące odpowiednio: cyklooksygenazę 2, syntazę tlenu azotu, syntetazę argininobursztynianową i interleukinę 1β, czyli enzymy i czynniki związane z fenotypem prozapalnym makrofagów), *Cxcl13* (gen kodujący chemoatraktant limfocytów B), *Ccl2* (gen kodujący Ccl2, występujący na makrofagach związanych z nowotworem o fenotypie immunostymulującym i będący wskaźnikiem skutecznej odpowiedzi przeciwnowotworowej komórek T (Yin i in. 2021)) oraz *Tnfrsf9* (kodujący CD137, znany także jako 4-1BB, który jest aktywującym punktem kontrolnym układu odpornościowego). Częsteczka 4-1BB wzmacnia funkcję cytotoksyczną limfocytów T CD8⁺ w skutek połączenia ze swoim ligandem 4-1BBL znajdującym się na makrofagach, zwiększając działanie przeciwnowotworowe (Stoll i wsp., 2021). Geny o obniżonej ekspresji w grupie RGD+anty-PD-1 w porównaniu z grupą anty-PD-1 obejmowały znane markery komórek linii mieloidalnej o fenotypie proinwazyjnym oraz supresory prozapalnej polaryzacji makrofagów, takie jak *Chil3*, *Mrc1*, *Fkbp5*, *Ms4a7*, *Vcan*, *Ecm1*, *Ccl8* i *Ocstamp*. Wersikan (kodowany przez *Vcan*), ulegający ekspresji w komórkach mieloidalnych, może tworzyć mikrośrodowisko przeciwzapalne i immunosupresyjne. Obserwowane zmiany transkryptomiczne w komórkach CD11b⁺ związanych z glejakiem mogą być powodem wyższej skuteczności w ograniczaniu wzrostu glejaków u myszy w przypadku podawania RGD+anty-PD-1 Ab w porównaniu z podawaniem samego anty-PD-1 Ab.

Geny obniżone RGD+anty-PD-1 vs anty-PD-1



Geny podwyższone RGD+anty-PD-1 vs anty-PD-1



Rycina 25. Profile transkryptyczne komórek CD11b⁺ izolowanych z mózgów myszy z glejakiem po podawaniu RGD+anty-PD-1 Ab w porównaniu z anty-PD-1 Ab.

Mapy ciepła typu Z-score dla wybranych genów reprezentują zmianę w ekspresji genów w komórkach CD11b⁺ ze zwierząt, którym podawano RGD+anty-PD-1 Ab w porównaniu z podawaniem anty-PD-1 Ab (każda kolumna reprezentuje ekspresję wybranego genu w CD11b⁺ z pojedynczej myszy, n=3-4/grupę)

8. DYSKUSJA

8.1. Modyfikacja immunosupresyjnego mikrośrodowiska złośliwych glejaków jako strategia terapeutyczna.

W mikrośrodowisku glejaka zarówno komórki nowotworowe, jak i zmienione komórki mieloidalne nagromadzające się w guzie, produkują szereg sygnałów hamujących funkcje limfocytów T efektorowych, co doprowadza do ucieczki nowotworu spod nadzoru układu odpornościowego. Koncepcja immunoterapii z wykorzystaniem przeciwciał przeciw immunologicznym punktom kontrolnym polega na zdolności tych przeciwciał do odwrócenia anergii limfocytów T w środowisku guza. Limfocyty otrzymują wówczas tylko sygnały aktywujące i odzyskują zdolność do zniszczenia komórek nowotworowych. Strategia ta okazała się niezwykle skuteczna w przypadku niektórych typów nowotworów i zrewolucjonizowała dotychczasowe metody terapii (Liu i wsp., 2024). Nadal jednak znaczny odsetek pacjentów onkologicznych (60-70%) nie odpowiada na takie leczenie. Do tej pory żadne badanie kliniczne III fazy z wykorzystaniem inhibitorów immunologicznych punktów kontrolnych nie przyniosło korzyści dla pacjentów z GBM (Bausart i wsp., 2022; Pearson i wsp., 2020). Brak odpowiedzi na leczenie przypisuje się immunosupresyjnemu mikrośrodowisku, które podobnie jak w przypadku innych „zimnych” nowotworów charakteryzuje się niedoborem cytotoksycznych limfocytów oraz przewagą komórek immunosupresyjnych (Arlaukas i wsp., 2017; Kim i wsp., 2017).

Zrozumienie mechanizmów oporności GBM na immunoterapie oraz poznanie elementów i mechanizmów działania immunosupresyjnego mikrośrodowiska otwiera drogę do nowych, bardziej skutecznych strategii terapeutycznych. Łączenie immunoterapii z działaniami nakierowanymi na przeprogramowanie TME staje się obiecującym podejściem, które sprawdza się w przedklinicznych modelach glejaków. Zahamowanie współwystępujących mechanizmów immunosupresji, zachodzących w głównej mierze z udziałem komórek mieloidalnych, może promować infiltrację i aktywację cytotoksycznych limfocytów T CD8⁺, działając synergistycznie z zastosowaną immunoterapią. Przykładem może być blokowanie szlaku CSF-1/CSF-1R (Pyonteck i wsp. 2013) lub interakcji chemokiny CCL2 z receptorem CCR2 (Flores-Toro i wsp., 2020), ważnych dla napływu do guza komórek mieloidalnych. CSF-1 jest czynnikiem niezbędnym do funkcjonowania i dojrzewania komórek mieloidalnych. Podawanie

inhibitora receptora CSF-1 (CSF-1R, np. PLX3397) zmniejsza liczbę makrofagów związanych z nowotworem i promuje odpowiedź przeciwnowotworową. Mimo iż w badaniach klinicznych u pacjentów z GBM inhibitor receptora CSF-1 pexidartinib (PLX3397) podawany doustnie przechodził przez barierę krew-mózg, nie wykazał on wystarczającej skuteczności terapeutycznej (Yan i wsp., 2017). Badania przedkliniczne sugerują, że PLX3397 może przynieść korzyści kliniczne, gdy będzie stosowany w połączeniu z immunoterapią z użyciem inhibitorów punktów kontrolnych (np. przeciwciałem anti-PD-1). Przystal i współautorzy testowali użycie przeciwciała anti-CSF1R łącznie z przeciwciałem anti-PD-1 w mysim modelu glejaka i zaobserwowali zmniejszenie wielkości guza po zasrosowaniu kombinacji obu czynników (Przystal i wsp., 2021). Inni badacze wykazali, iż połączenie blokady PD-1 i osi CCL2-CCR2 (receptora dla chemokiny CCL2) poprawiło przeżycie myszy z glejakiem i zmniejszyło napływ komórek MDSC do guza. Ponadto u tych zwierząt obserwowano zwiększoną infiltrację limfocytów T (Flores-Toro i wsp., 2020).

Powższe dane sugerują, że strategie ukierunkowane na komórki mieloidalne mogą zwiększać skuteczność przeciwnowotworową inhibitorów punktów kontrolnych i są w pełni zbieżne z wynikami przedstawionymi w niniejszej pracy. Najczęstszym wyborem w próbach klinicznych immunoterapii pacjentów z GBM jest celowanie w cząsteczkę PD-1 lub jej ligandy, stąd w zastosowanym modelu badawczym, testującym wpływ strategii modyfikujących mikrośrodowisko glejaka na efektywność immunoterapii, wykorzystano przeciwciało anti-PD-1. Zastosowany syngeniczny model mysiego glejaka, w którym komórki GL261 tdT⁺ luc⁺ implantowano do prążkowiec mózgu myszy, jest rutynowo wykorzystywany w badaniach immunoterapii w glejakach. Zwierzęta z nowotworem otrzymywały przeciwciało anti-PD-1 za pomocą iniekcji dootrzewnowych w 8, 10, 12 oraz 14 dniu po implantacji komórek glejaka. Immunoterapię łącono z doustnym podawaniem inhibitora arginazy – enzymu, którego nadmierna aktywność w komórkach GAM w guzie osłabia funkcjonalność limfocytów T, lub z podawaniem doguzowo peptydu RGD w celu zablokowania szlaku SPP1/integryny odpowiedzialnego za przeprogramowanie GAMs.

8.2. Przeciwnowotworowe działanie inhibitora arginazy w połączeniu z immunoterpią

ARG1 oraz ARG2 stanowią atrakcyjny cel terapeutyczny w leczeniu onkologicznym, dlatego że ich zablokowanie zwiększa skuteczność odpowiedzi przeciwnowotworowej zainicjowanej przez komórki układu odpornościowego (Steggerda i wsp., 2017). W niniejszej pracy zastosowano nowy inhibitor arginazy, OAT-1746, zsyntetyzowany przez firmę Molecule S.A., który w badaniach prowadzonych w Pracowni Neurobiologii Molekularnej hamował zależną od mikrogleju inwazyjność ludzkich i mysich komórek glejaka (Pilanc i wsp., 2021). Potwierdzeniem zasadności podjęcia próby modyfikacji mikrośrodowiska glejaków z użyciem związków celujących w arginazę była analiza publicznie dostępnych danych z sekwencjonowania pojedynczych komórek, która wykazała ekspresję obu izoform arginazy zarówno w komórkach nowotworowych, jak i GAMs, w próbkach guzów od pacjentów z GBM. Co więcej wyniki badań scRNAseq komórek CD11b⁺ z mysich glejaków GL261 pokazały, że ARG1, marker immunosupresyjnych komórek mieloidalnych, ulega wysokiej ekspresji w GAMs, głównie w makrofagach pochodzących z naciekających z obwodu monocytów, a w mniejszym stopniu w rezydentnym mikrogleju. Działanie inhibitora arginazy *in vivo* oceniano w mysim modelu glejaka, opartym na implantacji komórek GL261 tdT⁺luc⁺ do prążkowania mózgu myszy C57BL/6J. Inhibitor arginazy lub sól fizjologiczna, były podawane dożołądkowo, dwa razy dziennie, począwszy od pierwszego dnia po implantacji, natomiast przeciwciało anty-PD-1 było podawane dootrzewnono w 8, 10, 12 oraz 14 dniu po implantacji. Wykazano, iż OAT-1746 znacząco zwiększał poziom L-argininy w mózgu i osoczu myszy. Jest to o tyle istotne, że limfocyty cytotoksyczne wymagają do proliferacji egzogennej argininy (Lamas i wsp., 2012; Munder, 2006), a niski poziom argininy w osoczu wiąże się z immunosupresją u pacjentów z nowotworem (Zea i wsp., 2005).

Naturalnie występujące inhibitory arginazy obejmują: kwas chlorogenowy (CA) i piceatannol (PIC). Lucas i współautorzy wykazali, iż PIC, poprzez ścieżki związane z p-STAT3, NF-κB, indukuje apoptozę komórek nowotworowych i ogranicza wzrost i przerzuty raka piersi (Lucas i wsp., 2018). Związki te wykazują jednak niski potencjał hamowania arginazy oraz brak specyficzności. Znanych jest ponadto szereg syntetycznych inhibitorów arginaz, do których należą m.in. N(ω)-hydroksy-L-arginina (NOHA) i jej analogi, takie jak S-(2-boronoetylo)-L-cysteina (BEC), kwas 2(S)-amino-

6-boronoheksanowy (ABH), L-norwalinę i CB-1158 (Niu i wsp., 2022). Inhibitor NOHA wykazał działanie antyproliferacyjne w stosunku do różnych linii komórek nowotworowych, takich jak np. komórki MDA-MB-468 raka piersi (Singh i wsp., 2000) i komórki CACO-2 raka jelita grubego (Buga i wsp., 1998). Jednakże Abdelkawy i współautorzy wykazali, że związki BEC oraz ABH charakteryzują się niską biodostępnością, a tylko 5% danego inhibitora było wykrywane po pojedynczym podaniu doustnym. Ponadto związki z grupą główną kwasu borowego wykazują wysoką toksyczność wobec zdrowych komórek (Abdelkawy i wsp., 2017). Obiecującym inhibitorem ARG1 jest CB-1158, opracowany przez Calithera Biosciences. Steggerda i współpracownicy wykazali, że CB-1158 hamuje ARG1, tworząc środowisko prozapalne, co w konsekwencji prowadzi do zmniejszenia wielkości guza. Inhibitor ten został przetestowany *in vivo* w mysich modelach nowotworu płuc, jelita grubego, czerniaka, oraz sutka, jednak nie był testowany w przedklinicznym modelu glejaka (Steggerda i wsp., 2017). Obecnie trwają badania kliniczne mające na celu ocenę CB-1158 w monoterapii oraz terapii skojarzonej z anty-PD-1 w leczeniu zaawansowanych guzów litych (NCT02903914, NCT03314935 i NCT03361228).

W niniejszej rozprawie przedstawiono wyniki wskazujące, że podawanie OAT-1746 nie prowadziło do zmian wielkości guzów. Jednakże wykonane oznaczenia aktywności arginazy wskazywały, że podawanie OAT-1746 modyfikuje mikrośrodowisko glejaka i potencjalnie czyni je bardziej permissywnym do infiltracji limfocytów T. Było to silną przesłanką, aby połączyć OAT-1746 z anty-PD-1 Ab. W glejaku GL261 podawanie anty-PD-1 Ab nie wpływało na wielkość guza, chociaż szczegółowa analiza wykazała, że w przypadku połowy zwierząt, którym podawano anty-PD-1, guzy były mniejsze. Podawanie OAT-1746 z anty-PD-1 Ab spowodowało znaczny spadek wzrostu guza po 28 dniach od implantacji komórek glejaka. Przeprowadzono analizę cytometryczną komórek odpornościowych po dysocjacji mózgów myszy oraz analizę immunocytochemiczną wybranych markerów komórkowych. Analiza skrawków histologicznych wykazała, że podawanie anty-PD1 Ab nie wpłynęło na akumulację komórek $Iba1^{+}$ i $Arg1^{+}$ w glejakach, natomiast komórki $CD8^{+}$ były wyraźnie zlokalizowane na marginesie guza. Ocena ilościowa gęstości limfocytów T wykazała zwiększoną liczbę komórek $CD8^{+}$ u myszy, w których guzy były mniejsze po podawaniu anty-PD1 Ab. Han i współautorzy wykazali, iż wyższa infiltracja limfocytów T $CD8^{+}$ jest związana z lepszą odpowiedzią na immunoterapię u pacjentów (Han i wsp.,

2016). Podanie OAT-1746 nie zmieniło odsetka mikrogleju ($CD11b^+CD45^{\text{niski}}$) i monocytów/makrofagów pochodzenia obwodowego ($CD11b^+CD45^{\text{wysoki}}$) w glejakach GL261. Jednakże zaobserwowano nieznacznie zwiększony odsetek limfocytów T $CD3^+$ po podawaniu OAT-1746 z anty-PD-1 Ab. Wyniki te wskazywały na zmiany w mikrośrodkowisku nowotworu, które modulowały progresję glejaka oraz wzmacniały odpowiedź na anty-PD-1 Ab.

Dalsze badania wykazały, że podawanie OAT-1746 znacząco zmieniło profil transkryptomiczny komórek $CD11b^+$, wysortowanych z półkul mózgów myszy. Analiza wzbogacenia wśród genów o różnicowej ekspresji w porównaniu z kontrolą, z wykorzystaniem anotacji genów do procesów wg. definicji Gene Ontology, ujawniła wzrost ekspresji genów zaangażowanych w procesy, takie jak transdukcja sygnału zależna od GTPaz, różnicowanie komórek mieloidalnych, sygnalizacja NF- κ B oraz regulacja odpowiedzi zapalnej. Wysoka ekspresja genów związanych ze stanem zapalnym, takich jak *Gpr34* i *Duoxa1*, wskazuje na przeprogramowanie GAMs w kierunku fenotypu prozapalnego. GPR34 jest receptorem sprzężonym z białkami Gi/o (ang. Gi/o protein-coupled receptor 34), wiążącym lizofosfatydylserynę i aktywowanym w odpowiedzi na uszkodzenie tkanek. W mikrogleju GPR34 uczestniczy w fagocytozie (Etani i wsp. 2024), a *Duoxa1* (ang. *Dual oxidase maturation factor 1*) w stanie zapalnym i produkcji cytokin (Morris i wsp., 2022). Ponadto analiza transkryptomiczna wykazała zwiększenie ekspresji kilku genów biorących udział w przeciwnowotworowej odpowiedzi układu odpornościowego, takich jak *Nos2*, *Ifng*, *Tlr4* i *CD86*, po podawaniu OAT-1746+anty-PD-1 Ab. Geny związane z różnicowaniem i aktywnością cytotoksyczną komórek NK uległy znacznemu podwyższeniu po podawaniu anty-PD-1 Ab i OAT-1746+anty-PD-1 Ab. Dodatkowo obniżenie poziomu genów kodujących białka działające jako supresory odpowiedzi odpornościowej: *ApoE*, *CD69* (Mita i wsp., 2018b) w grupach OAT-1746 i OAT-1746+anty-PD-1 wskazuje na przywrócenie funkcji przeciwnowotworowych komórek $CD11b^+$, co może wyjaśniać obserwowaną skuteczność kombinacji w ograniczaniu wzrostu glejaka. Zatem wykazano, iż OAT-1746 wywołuje kompleksowe przeprogramowanie komórek $CD11b^+$ w kierunku fenotypu prozapalnego i sprzyja zmianom w mikrośrodkowisku glejaka.

Badany inhibitor arginazy OAT-1746 nie wykazywał toksyczności u zwierząt doświadczalnych po wielokrotnym podaniu doustnym, zarówno w modelu użytym w niniejszej pracy, jak i w innych modelach nowotworów, co podkreśla bezpieczeństwo

związku w warunkach przedklinicznych (Czystowska-Kuzmich i wsp., 2019). Zastosowanie inhibitora arginazy jako monoterapii spowodowało zmiany w TME nowotworu u myszy z glejakami, jednak nie było to wystarczające do zahamowania wzrostu guzów. W związku z tym firma Molecule nie zdecydowała się na wprowadzenie tego związku do badań klinicznych dla pacjentów z glejakiem. Możliwe, że brak efektu inhibitora na wielkość guza był spowodowany niewystarczającą ilością związku przenikającą do mózgu. Rozwiązaniem tego problemu mogłoby być potencjalnie bezpośrednie podanie domózgowe, co pozwoliłoby ominąć zarówno BBB, jak i inne bariery i czynniki w organizmie, które wpływają na biodostępność leków podawanych doustnie. Należy jednak zaznaczyć, że opisany w niniejszej pracy inhibitor arginazy znajduje się aktualnie w I fazie badań klinicznych mającej na celu określenie jego potencjału przeciwnowotworowego u pacjentów z wybranymi zaawansowanymi i przerzutowymi guzami litymi, w tym rakiem jelita grubego, rakiem jajnika, rakiem trzustki i rakiem nerki (NCT05759923). Synergistyczne działanie inhibitora arginazy i immunoterapii z użyciem przeciwciała anti-PD-1, wykazane w niniejszej pracy, stanowi ponadto przesłankę do przyszłych strategii w leczeniu glejaków.

8.3. Użycie peptydu blokującego szlak SPP1/integryny do wzmocnienia efektu immunoterapii z anti-PD-1 Ab

Kolejną strategią terapeutyczną zaproponowaną w niniejszej pracy doktorskiej w celu poprawy efektywności przeciwciała anti-PD-1 było zablokowanie interakcji Spp1 - receptory integrynowe przy użyciu peptydu RGD. W Pracowni Neurobiologii Molekularnej wykazano, iż jednym z istotnych czynników biorących udział w interakcji komórek glejaka z mikrośrodowiskiem guza jest Spp1. Stabilne wyciszenie ekspresji genu *Spp1* w komórkach szczurzego glejaka znacząco obniżało wzrost guzów, ponadto blokowało gromadzenie w guzie ameboidalnych GAMs o fenotypie pronowotworowym (Ellert-Miklaszewska i wsp., 2016b) i zwiększało napływ limfocytów T cytotoksycznych będących źródłem interferonu γ (praca doktorska dr Dominiki Pszczółkowskiej). W celu zablokowania aktywności Spp1 w mikrośrodowisku nowotworu oraz jej oddziaływania na infiltrujące glejaki GAMs, został zaprojektowany peptyd (kompetycyjny inhibitor integryn, zawierający motyw RGD). Peptyd ten hamował indukowaną przez glejaka pronowotworową aktywację, migrację i fagozytozę przez komórki mikrogleju *in vitro* (Ellert-Miklaszewska i wsp., 2016b). Pomimo opisanego udziału integryn w

nowotworach, ich zaangażowanie w funkcjonalną regulację komórek mieloidalnych infiltrujących guz nie zostało dostatecznie zbadane. GAMs są głównym składnikiem mikrośrodowiska glejaka i przyczyniają się do wzrostu nowotworu oraz osłabiają odpowiedź przeciwnowotworową (Hambardzumyan i wsp., 2016; Ochocka i wsp., 2021). Dane przedkliniczne z modeli glejaka u gryzoni, wskazują na istotność przekazywania sygnału przez integryny $\alpha\beta3/\alpha\beta5$ w rekrutacji (Zhou i wsp., 2015) oraz kształtowaniu fenotypu GAMs (Wei i wsp., 2018).

W niniejszej rozprawie wykazano, iż podawany do guza peptyd RGD zapobiega przeprogramowaniu GAMs w immunosupresyjne komórki, wspierające wzrost glejaka, co nie wystarcza jednak do zahamowania wzrostu guza. Połączenie RGD z anty-PD-1 znacząco hamuje natomiast wzrost glejaka u myszy. Badania biodystrybucji peptydu ze znacznikiem fluorescencyjnym FITC w mózgu myszy z glejakiem pokazały, że peptyd RGD rozprzestrzeniał się w parenchymie mózgu, chociaż największy sygnał zaobserwowano w pobliżu kaniuli, która doprowadzała peptyd do guza. Ponadto analiza spektrometrii mas peptydu RGD inkubowanego w pompach osmotycznych nie wykazała żadnych produktów degradacji ani spadku poziomu peptydu podczas inkubacji, co potwierdza jego stabilność w roztworze wodnym. Pozytywne dane z biodystrybucji peptydu oraz jego stabilności w pompie osmotycznej pozwoliły na przeprowadzenie badania *in vivo* w mysim modelu glejaka.

Peptyd RGD podawano do guza przy użyciu pompy osmotycznej, której kaniula była implantowana w to samo miejsce, co komórki glejaka. Peptyd oddziaływał na rozwój guza od momentu implantacji komórek mysiego glejaka GL261 tdT⁺luc⁺. Wyniki rezonansu magnetycznego wykazały brak różnic w wielkości guzów w porównaniu z grupą kontrolną, która otrzymywała wodę. Zwrócono natomiast uwagę na przyrost wagi myszy, który uznawany jest jako wskaźnik dobrostanu zwierząt w doświadczalnych modelach nowotworu. Waga myszy, którym podawano peptyd RGD znacznie wzrosła, podczas gdy zwierzęta, które otrzymywały peptyd kontrolny (RAE) lub wodę, straciły na wadze w miarę upływu czasu lub ich waga pozostała niezmienną.

Aby zrozumieć pozytywny wpływ podawania peptydu RGD na mikrośrodowisko glejaka zbadano transkryptom komórek CD11b⁺ oraz przeprowadzono analizę immunohistochemiczną skrawków mózgów myszy z grup doświadczalnych. Dzięki profilowaniu transkryptomu wykazano, że podawanie RGD indukuje zmianę fenotypu GAMs w mysim glejaku GL261. Ekspresja genów związanych z fenotypem

promującym wzrost nowotworu (takich jak *Arg1*, *Mrc1*, *Il18bp*) uległa obniżeniu, podczas gdy geny związane z chemotaksją limfocytów T, funkcją cytotoksyczną komórek NK oraz produkcją prozapalnych cytokin wykazywały podwyższoną ekspresję w GAMs u myszy, którym podawano RGD. Zgodnie z danymi transkryptomicznymi, w GAMs w guzach u myszy, którym podawano RGD, poziom *Arg1* był niższy w porównaniu z grupą kontrolną. Wynik ten potwierdziła analiza immunohistochemiczna skrawków mózgów z guzem, w której wykazano zmniejszony odsetek komórek $Iba1^{++} Arg1^{+}$ w grupie myszy otrzymujących RGD.

Arginaza metabolizuje L-argininę, która jest aminokwasem niezbędnym dla prawidłowej proliferacji limfocytów T. Obserwowana zmiana fenotypu GAMs, indukowana przez RGD, może zatem również przyczyniać się do poprawy odpowiedzi na inhibitory punktów kontrolnych. Jak wykazał Lee i wsp., blokada PD-1 wywołała aktywację limfocytów T, jednak nie była w stanie przewyżżyć supresyjnego działania makrofagów związanych z guzem u pacjentów ze wznową GBM (Lee i wsp., 2021). Podobny brak wpływu anty-PD-1 Ab na wielkość glejaka potwierdzono w niniejszej rozprawie. Jednakże działanie peptydu RGD na tyle zmieniało mikrośrodowisko, że podawanie przeciwciała anty-PD-1 z RGD zmniejszało wielkość guza w 28 dni po implantacji komórek glejaka. Podawanie przeciwciała anty-PD-1 samodzielnie, jak i w połączeniu z peptydem RGD, prowadziło do obniżenia ekspresji markerów proinwazyjnych (takich jak *Gpnmb* i *Mrc1*) oraz do zwiększenia ekspresji genów związanych z prezentacją antygenów, szlakiem sygnałowym interferonu, wrodzoną odpowiedzią immunologiczną oraz wydzielaniem czynników chemotaktycznych dla limfocytów T. Należy jednak zaznaczyć, iż podawanie przeciwciała anty-PD-1 wywołuje odpowiedź związaną z mechanizmem sprzężenia zwrotnego (Niesel i wsp., 2021), charakteryzującą się zwiększoną ekspresją ARG1 i PD-L1 na komórkach mieloidalnych oraz utrzymującym się wysokim poziomem komórek Tregs, które przeciwdziałają reaktywacji komórek T po immunoterapii. Wielu badaczy potwierdza, iż w celu wytworzenia lokalnej odpowiedzi przeciwnowotworowej prowadzącej do zmniejszenia wielkości guza, niezbędne są: przeprogramowane komórki mieloidalne o fenotypie prozapalnym, efektorowe limfocyty T oraz zmniejszony odsetek komórek Tregs (Kamada i wsp., 2019; Onda i wsp., 2019). Co więcej, ekspresja markerów fenotypu immunosupresyjnego, takich jak PD-L1, na makrofagach jest związana z gorszym rokowaniem i opornością na immunoterapię u pacjentów z GBM (Aslan i wsp., 2020).

Dlatego też zmniejszenie ekspresji tych cząsteczek immunosupresyjnych w GAMs w grupie RGD+anty-PD-1 prawdopodobnie przyczyniło się do poprawy skuteczności immunoterapii.

Przeprogramowanie komórek mieloidalnych związanych z guzem i ograniczenie ich aktywności immunosupresyjnej w grupie myszy otrzymujących RGD+anty-PD-1 było związane z poprawą nadzoru limfocytów T w mikrośrodowisku guza, co objawiało się zwiększonym odsetkiem i proliferacją limfocytów CD8⁺ w guzie, zmniejszoną liczbą komórek Tregs o fenotypie immunosupresyjnym oraz wyższym stosunkiem CD8⁺/Tregs. Ponadto podawanie RGD+anty-PD-1 Ab pobudziło produkcję IFN γ przez efektorowe limfocyty CD8⁺ infiltrujące guz. Zgodnie z zaobserwowaną wzmocnioną odpowiedzią przeciwnowotworową, najwyższe stężenie IFN γ , granzymu B oraz TNF α wykryto w środowisku guzów u myszy w grupie RGD+anty-PD-1. Wykazano też zwiększony napływ limfocytów T, co mogło wynikać z podwyższonych poziomów cytokin: CCL3, CCL5 i CXCL10. Przy czym, jednocześnie, podawanie RGD+anty-PD-1 Ab osłabiło mechanizmy hamujące prawidłowe działanie limfocytów T w mikrośrodowisku guza, co skutkowało zwiększoną proliferacją i aktywacją limfocytów T, niezbędnymi do skutecznej odpowiedzi przeciwnowotworowej.

Receptory integrynowe $\alpha\beta 3$ i $\alpha\beta 5$ mają podwyższoną ekspresję na komórkach śródbłonna, tworzących nowe naczynia krwionośne w GBM. Inhibitory celujące w te integryny, takie jak np. cykliczny peptyd Cilengitide, działają jako czynniki antyangiogenne (Katsamakos i wsp., 2017). W przeprowadzonych w niniejszej pracy badaniach z udziałem peptydu RGD wykazano, iż dostarczanie peptydu bezpośrednio do guza prowadziło również do poprawy struktury i gęstości naczyń krwionośnych (Ellert-Miklaszewska A, Pilanc P i wsp., 2025). Wpływ peptydu na angiogenezę nie był tematem niniejszej rozprawy doktorskiej, dlatego też analizy dotyczące integralności naczyń, nie zostały zawarte w wynikach rozprawy. Jednak należy podkreślić, iż zwiększona gęstość strukturalnie poprawionych naczyń krwionośnych obserwowana po podawaniu RGD mogła przyczynić się do wzmocnionej odpowiedzi na przeciwciała anty-PD-1 u myszy z glejakiem. Wiąże się to z faktem, że szybko powstające naczynia krwionośne w guzie nie funkcjonują prawidłowo, prowadząc do powstania ognisk niedotlenienia oraz upośledzając transport limfocytów do guza, co z kolei skutkuje niedostateczną odpowiedzią na immunoterapię. Do nadmiernej angiogenezy przyczyniają się zarówno komórki nowotworowe, jak i GAMs, będąc źródłem VEGF (z ang. *vascular endothelial*

growth factor) i innych proangiogennych cząsteczek sygnałowych. Koncepcja normalizacji naczyń zakłada przywrócenie prawidłowego procesu wzmacniania i dojrzewania naczyń. Normalizacja naczyń wywołana terapią antyangiogenną np. z użyciem przeciwciał anti-VEGF zwiększa infiltrację limfocytów T, zmniejsza niedotlenienie, a tym samym immunosupresję w obrębie guzów (Ghosh i wsp., 2022).

Przykładem blokowania interakcji integryn przy użyciu peptydu jest wspomniany powyżej cykliczny pentapeptyd zawierający motyw RGD – Cilengitide. Jest to pierwszy inhibitor integrynowej podjednostki α_v , który został wprowadzony do III fazy badań klinicznych w leczeniu GBM jako środek anty-angiogeny (Weller i wsp., 2016). Efektywność Cilengitidu (przy jednoczesnej niskiej toksyczności) obserwowano u pacjentów z GBM w badaniach klinicznych fazy I/IIa, zarówno po podaniu samodzielnym, jak i w połączeniu z radio- i chemioterapią (Kurozumi i wsp., 2012). Te obiecujące obserwacje nie przełożyły się jednak na wydłużenie czasu przeżycia pacjentów w randomizowanych badaniach III fazy na dużej grupie pacjentów. Podobne wyniki otrzymano po zastosowaniu Voloksimabu oraz MINT1526A, przeciwciał skierowanych przeciwko integrynom $\alpha_5\beta_1$ (Weekes i wsp., 2018). Przypuszczalnie ich niska skuteczność wynikała z krótkiego okresu półtrwania tych cząsteczek oraz ich szybkiego usuwania przez organizm pacjenta. Choć bariera krew-mózg w GBM ulega rozszczelnieniu, to w dalszym ciągu może stanowić fizyczną barierę dla penetracji cząsteczek terapeutycznych do układu nerwowego, co utrudniałoby osiągnięcie i utrzymanie terapeutycznego stężenia leku w guzie (Tucci i wsp., 2014). Brak istotnego efektu terapeutycznego zmniejszył atrakcyjność hamowania ścieżek sygnałowych zależnych od integryn jako celu terapeutycznego, jednak obiecujący wydaje się powrót do tej koncepcji przy wykorzystaniu nanotechnologii. Zamknięcie cilengitidu w nanokapsułkach złożonych z heparyny i poloksameru powodowało bardziej wydajne przekraczanie leku przez barierę krew-mózg i zwiększoną jego akumulację w guzie w szczurzym modelu glejaka (Zhao i wsp., 2016).

Cilengitid podawany był jako lek antyangiogeny, brak jest zatem dostępnych danych dotyczących jego wpływu na napływ i funkcje komórek układu odpornościowego. Trudno zatem odnieść zgromadzone informacje do wyników niniejszej pracy. Jako potencjalną przyczynę niepowodzenia w terapii glejaków podaje się brak odpowiedniej stratyfikacji pacjentów, która miała uwzględniać poziom ekspresji docelowych receptorów integrynowych (Weller i wsp., 2016). Prezentowane w niniejszej

pracy wyniki zachęcają do dalszych badań nad inhibicją sygnalizacji integrzyn w ludzkich GBMs i wskazują na jej możliwe zastosowanie kliniczne. Ponadto ponowne zbadanie odpowiedzi pacjentów na wcześniejsze terapie przeciw-integrzynowe z perspektywy ich wpływu na komórki mieloidalne może rzucić światło na potencjalne korzyści płynące z połączenia blokady integrzyn z immunoterapią.

8.4. Perspektywy, wyzwania i krytyczna ocena możliwości użycia badanych strategii terapeutycznych w praktyce klinicznej

Mimo iż kilka inhibitorów immunologicznych punktów kontrolnych wykazało obiecujące wyniki w badaniach przedklinicznych na mysim modelu glejaka, ich skuteczność w badaniach klinicznych była niezadowalająca. Sugeruje to, że wykorzystywane modele mysiego glejaka mają pewne ograniczenia. Niemniej jednak są one niezbędne do badania rozwoju glejaka i oceny skuteczności terapii eksperymentalnych. Modele oparte o wszczepianie komórek nowotworowych zapewniają przewidywalność lokalizacji guza i tempa wzrostu, ułatwiając jednocześnie badanie interakcji między glejakami a układem odpornościowym (Haddad i wsp., 2021). Guzy rozwijające się po implantacji komórek GL261 mają wiele wspólnych cech histologicznych z ludzkim GBM, takich jak np.: występowanie obszarów martwicy czy neowaskularyzacja. Biorąc pod uwagę łatwą i stabilną hodowlę *in vitro*, komórki glejaka GL261 stanowią dogodny model do badania mechanizmów molekularnych wpływających na progresję GBM oraz badań nad nowymi strategiami leczenia pacjentów z glejakiem (Abdelwahab i wsp., 2011). Należy jednak podkreślić, iż znacząca immunogenność komórek GL261 nie pokrywa się z cechami ludzkiego GBM, co może zwiększać odsetek wyników fałszywie dodatnich w badaniach przedklinicznych glejaków GL261 (Szatmári i wsp., 2006). W związku z tym, przed wejściem w fazę badań klinicznych, konieczne byłoby zweryfikowanie działania potencjalnej terapii w innych modelach glejaka.

Warto wziąć pod uwagę, że dodatkowe korzyści terapeutyczne mogłaby przynieść optymalizacja momentu podania inhibitorów PD-1 z innymi immunomodulatorami. Przeprowadzono badanie kliniczne pacjentów z GBM, w którym wykazano, że grupa otrzymująca pembrolizumab przed resekcją chirurgiczną (ang. *neoadjuvant*), z kontynuowaną terapią po operacji (ang. *adjuvant*) miała znacząco wydłużony czas przeżycia w porównaniu do pacjentów, którzy otrzymywali przeciwciało anti-PD-1

wyłącznie po operacji. Wyniki te wskazują, że przedoperacyjne podanie inhibitorów PD-1 wzmacnia odpowiedź i może okazać się bardziej skutecznym podejściem do leczenia GBM (Cloughesy i wsp., 2019).

Uwzględniając przyczyny braku skuteczności immunoterapii u pacjentów z GBM, należy pamiętać o zjawisku pseudoprogresji, czyli sytuacji, w której guzy w ocenie obrazowej (np. MRI) wydają się być większe po podaniu immunoterapii, niż przed leczeniem. Taka sytuacja jest związana z napływem limfocytów do tkanki guza i w wielu przypadkach oznacza raczej pozytywne rokowanie. Zjawisko to występuje w terapii z wykorzystaniem inhibitorów immunologicznych punktów kontrolnych oraz z zastosowaniem wirusów onkolitycznych. W pierwszych latach rozwoju immunoterapii pseudoprogresja była jednak błędnie interpretowana jako postęp choroby, co często doprowadzało do zaprzestania leczenia (Nishino, 2016). Dopiero zmiana kryteriów odpowiedzi i ustalenie nowej skali iRECIST (radiologiczne kryteria oceny odpowiedzi na leczenie guzów) umożliwiły lepsze monitorowanie postępu leczenia (Persigehl i wsp., 2020). Należałoby pochylić się nad wynikami wcześniejszych badań klinicznych, w których błędna interpretacja pseudoprogresji mogła spowodować wstrzymanie badania z powodu braku efektu terapeutycznego. Tym niemniej, biorąc pod uwagę liczbę przeprowadzonych dotychczas badań klinicznych z zastosowaniem przeciwciał przeciwko immunologicznym punktom kontrolnym, możemy wnioskować, iż zastosowanie pojedynczego immunomodulatora jest nieskuteczne w przypadku GBM, a jedynie metody leczenia łączące inhibitory punktów kontrolnych z innymi terapiami modulującymi mikrośrodowisko mają szansę poprawić uzyskiwane efekty terapeutyczne. Zatem zasadne jest kontynuowanie badań służących dokładnemu zbadaniu specyficznego TME w glejakach, aby stworzyć terapię skojarzoną, która może pokonać mechanizm oporności i polepszyć wyniki terapeutyczne u pacjentów z GBM.

Choć przedstawione w rozprawie wyniki wskazują na nowe możliwości terapeutyczne dla pacjentów z GBM, należy podkreślić pewne ograniczenia naszych badań. Zastosowany model mysiego glejaka (w obu przedstawionych strategiach terapeutycznych), w którym zwierzęta otrzymują badane cząsteczki bezpośrednio po implantacji komórek nowotworowych, odzwierciedla sytuację kliniczną, w której leki podawane są po resekcji bezpośrednio do łoża pooperacyjnej, aby zapobiec wznowie. Obecnie podaje się w ten sposób chemioteraputyk karmustynę (tzw. Gliadel- 78 Carmustine wafers). Specjalny materiał nasączony lekiem jest umieszczany w łoży

pooperacyjnej i tam pozostawiany. Taki sposób podania omija barierę krew-mózg. Nawrót choroby w przypadku glejaków jest niestety dość powszechny i wysoki odsetek pacjentów doświadcza wznowy guza po początkowym leczeniu. Badania wskazują, że około 90% pacjentów z glejakiem będzie miało nawrót choroby w ciągu dwóch lat od wstępnej diagnozy. Wznowa jest spowodowana przede wszystkim intensywnym rozwojem glejaka i jego zdolnością do naciekania zdrowej tkanki mózgu. Jednym ze znaczących czynników przyczyniających się do nawrotu guza jest obecność komórek nowotworowych, które pozostają w mózgu po niepełnej resekcji. Nawracający GBM często jest trudniejszy w leczeniu w porównaniu z guzem pierwotnym (Djamel-Eddine i wsp., 2019). Poszukiwanie nowych terapii lub przemyślane ich łączenie to kluczowy krok w celu poprawy jakości życia osób zmagających się z glejakami.

Potencjalnym wyzwaniem strategii z użyciem peptydu może być jego ograniczona stabilność po podaniu systemowym. W badaniach klinicznych, można by jednak podawać peptyd do żyły pooperacyjnej, jak opisano powyżej, co jednocześnie zapewniałoby możliwość uzyskania wysokiego miejscowego stężenia peptydu. Podczas podawania peptydów obwodowo są one szybko degradowane przez liczne proteazy występujące we krwi (przy podaniach dożylnych) lub w układzie pokarmowym (przy podaniach doustnych) lub są w krótkim czasie po podaniu usuwane z organizmu przez wątrobę i nerki. W przestrzeniach międzykomórkowych w mózgu nie ma wielu proteaz, więc ryzyko, że peptyd zostanie zdegradowany jest niewielkie. W badaniach opisanych w niniejszej pracy peptyd RGD w roztworze wodnym był stabilny przez min. 3 tygodnie, czyli przez czas, w jakim peptyd podawany myszom znajdował się w pompie osmotycznej. Opracowanie zmodyfikowanych peptydów o większej stabilności lub użycie metody dostarczania z wykorzystaniem infuzji do mózgu wzmocnionej konwencją (CED, ang. *convection-enhanced delivery*) może przewyżżyć tego rodzaju trudności w przyszłości.

Warto podkreślić, że peptydy są coraz szerzej wykorzystywane w praktyce klinicznej. Pierwszymi peptydami stosowanymi terapeutycznie były odpowiedniki naturalnych ludzkich hormonów, takich jak insulina, oksytocyna, wasopresyna i hormon uwalniający gonadotropinę (Craik i wsp., 2013). W ostatnich latach poczyniono ogromne postępy w kierunku wykorzystania peptydów w leczeniu nowotworów i chorób metabolicznych. Obecnie peptydy o potencjalnym zastosowaniu w terapiach przeciwnowotworowych mają na celu blokowanie specyficznych ścieżek sygnałowych

(wewnątrzkomórkowych lub oddziaływań ligand-receptor błonowy na powierzchni komórki), doprowadzenie bezpośrednio do śmierci komórek rakowych (np. poprzez nakierowanie czynników toksycznych, uszkodzenie błony komórkowej), blokowanie enzymów zewnątrzkomórkowych lub doprowadzenie do przeprogramowania układu odpornościowego pacjenta wzmagając reakcję przeciwnowotworową. Szczególnie intensywnie rozwijane jest użycie peptydów jako cząsteczek celujących w określone komórki w diagnostyce nowotworów oraz jako narzędzia terapeutycznego (Bolhassani, 2011; Vivès i wsp., 2008). Została stworzona baza danych TumorHoPe, która zawiera informacje dotyczące sekwencji danego peptydu, docelowego nowotworu oraz techniki identyfikacji peptydu (Kapoor i wsp., 2012). Peptyd CREKA, który wiąże się z kompleksem fibryna–fibronektyna (Hoffman i wsp., 2003) został użyty jako peptyd naprowadzający oraz nośnik do transportu czynników cytotoksycznych. Ponadto LyP-1, 9-aminokwasowy peptyd, specyficznie wiążący neuropilinę, która ulega nadmiernej ekspresji na powierzchni komórek glejaka i śródbłónka, został użyty jako nośnik dla paklitakselu i znacząco poprawił jego skuteczność w leczeniu glejaka (Hu i wsp., 2013). Także peptydy z sekwencją RGD stosowano jako elementy koniugatów do selektywnego dostarczania leków przeciwnowotworowych (Chen i wsp., 2012). Zhan i współautorzy zaprojektowali i przebadali peptyd z sekwencją RGD z paklitakselem (PTX). Podobne badania z zastosowaniem metotreksatu lub doksorubicyny (DOX) wykazały silną skuteczność przeciwnowotworową (Belhadj i wsp., 2017). Podane powyżej przykłady pokazują praktyczne możliwości zastosowania peptydów pomimo obaw o ich stabilność. Dają więc nadzieję na rozwój leków peptydowych i być może zastosowanie naszej nowatorskiej strategii w leczeniu glejaków.

9. PODSUMOWANIE I WNIOSKI

Celem niniejszej pracy było opracowanie nowych strategii reaktywacji przeciwnowotworowej odpowiedzi w mysim modelu GBM i uwrażliwienie guzów na przeciwciało anti-PD-1. Wykorzystano dwa podejścia terapeutyczne: i) blokowanie aktywności arginazy 1 za pomocą OAT-1746, oraz ii) zablokowanie pochodzącej z glejaka Spp1 za pomocą krótkiego peptydu RGD.

Wyniki uzyskane w badaniach przedstawionych w rozprawie pozwalają na wysunięcie następujących wniosków:

1. Podawanie OAT-1746 nie wpłynęło na wielkość guzów w porównaniu z grupą kontrolną.
2. Profil transkryptomiczny komórek CD11b⁺ izolowanych z guzów u zwierząt otrzymujących OAT-1746 wskazywał na zmniejszoną ekspresję genów zaangażowanych we wspieranie nowotworu.
3. Inhibitor arginazy hamował nabywanie immunosupresyjnego fenotypu przez komórki mieloidalne w guzie, a w kombinacji z przeciwciałem anti-PD-1 redukowało wzrost glejaka u myszy.
4. Podawanie peptydu RGD nie wpływało na wielkość guza, ale hamowało nagromadzenie w mikrośrodku nowotworu mikrogleju/makrofagów o proinwazyjnym fenotypie.
5. Zmiany transkryptomiczne wskazały na przeprogramowanie komórek CD11b⁺ związanych z nowotworem po podaniu peptydu RGD oraz silną indukcję odpowiedzi prozapalnej po podaniu anti-PD-1, zwłaszcza w kombinacji z peptydem.
6. Kombinacja peptydu RGD oraz anti-PD-1 prowadziła do zwiększonego napływu limfocytów T cytotoksycznych, zmniejszenia odsetka limfocytów regulatorowych oraz spowolnienia wzrostu guza.

10. PIŚMIENNICTWO

1. Abdelkawy, K.S., Lack, K., Elbarbry, F., 2017. Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Promising Arginase Inhibitors. *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.* 42, 355–370. <https://doi.org/10.1007/s13318-016-0381-y>
2. Abdelwahab, M.G., Sankar, T., Preul, M.C., Scheck, A.C., 2011. Intracranial Implantation with Subsequent 3D In Vivo Bioluminescent Imaging of Murine Gliomas. *J. Vis. Exp.* 3403. <https://doi.org/10.3791/3403>
3. Alcantara Llaguno, S.R., Parada, L.F., 2016. Cell of origin of glioma: biological and clinical implications. *Br. J. Cancer* 115, 1445–1450. <https://doi.org/10.1038/bjc.2016.354>
4. Allen, F., Bobanga, I.D., Rauhe, P., Barkauskas, D., Teich, N., Tong, C., Myers, J., Huang, A.Y., 2018. CCL3 augments tumor rejection and enhances CD8⁺ T cell infiltration through NK and CD103⁺ dendritic cell recruitment via IFN γ . *OncoImmunology* 7, e1393598. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2017.1393598>
5. Andersson, J., Tran, D.Q., Pesu, M., Davidson, T.S., Ramsey, H., O'Shea, J.J., Shevach, E.M., 2008. CD4⁺FoxP3⁺ regulatory T cells confer infectious tolerance in a TGF- β -dependent manner. *J. Exp. Med.* 205, 1975–1981. <https://doi.org/10.1084/jem.20080308>
6. Arlauckas, S.P., Garriss, C.S., Kohler, R.H., Kitaoka, M., Cuccarese, M.F., Yang, K.S., Miller, M.A., Carlson, J.C., Freeman, G.J., Anthony, R.M., Weissleder, R., Pittet, M.J., 2017. In vivo imaging reveals a tumor-associated macrophage-mediated resistance pathway in anti-PD-1 therapy. *Sci. Transl. Med.* 9, eaal3604. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aal3604>
7. Aslan, K., Turco, V., Blobner, J., Sonner, J.K., Liuzzi, A.R., Núñez, N.G., De Feo, D., Kickingeder, P., Fischer, M., Green, E., Sadik, A., Friedrich, M., Sanghvi, K., Kilian, M., Cichon, F., Wolf, L., Jähne, K., Von Landenberg, A., Bunse, L., Sahm, F., Schrimpf, D., Meyer, J., Alexander, A., Brugnara, G., Röth, R., Pflöderer, K., Niesler, B., Von Deimling, A., Opitz, C., Breckwoldt, M.O., Heiland, S., Bendszus, M., Wick, W., Becher, B., Platten, M., 2020. Heterogeneity of response to immune checkpoint blockade in hypermutated experimental gliomas. *Nat. Commun.* 11, 931. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-14642-0>
8. Bagley, S.J., Kothari, S., Rahman, R., Lee, E.Q., Dunn, G.P., Galanis, E., Chang, S.M., Nabors, L.B., Ahluwalia, M.S., Stupp, R., Mehta, M.P., Reardon, D.A., Grossman, S.A., Sulman, E.P., Sampson, J.H., Khagi, S., Weller, M., Cloughesy, T.F., Wen, P.Y., Khasraw, M., 2022. Glioblastoma Clinical Trials: Current Landscape and Opportunities for Improvement. *Clin. Cancer Res.* 28, 594–602. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-21-2750>
9. Baitsch, D., Bock, H.H., Engel, T., Telgmann, R., Müller-Tidow, C., Varga, G., Bot, M., Herz, J., Robenek, H., Von Eckardstein, A., Nofer, J.-R., 2011. Apolipoprotein E Induces Antiinflammatory Phenotype in Macrophages. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 31, 1160–1168. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.111.222745>
10. Bausart, M., Pr  at, V., Malfanti, A., 2022. Immunotherapy for glioblastoma: the promise of combination strategies. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 41, 35. <https://doi.org/10.1186/s13046-022-02251-2>

11. Belhadj, Z., Zhan, C., Ying, M., Wei, X., Xie, C., Yan, Z., Lu, W., 2017. Multifunctional targeted liposomal drug delivery for efficient glioblastoma treatment. *Oncotarget* 8, 66889–66900. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.17976>
12. Bello, L., Francolini, M., Marthyn, P., Zhang, J., Carroll, R.S., Nikas, D.C., Strasser, J.F., Villani, R., Cheresch, D.A., Black, P.McL., 2001. $\alpha\beta 3$ and $\alpha\beta 5$ Integrin Expression in Glioma Periphery. *Neurosurgery* 49, 380–390. <https://doi.org/10.1097/00006123-200108000-00022>
13. Blank, T., Prinz, M., 2013. Microglia as modulators of cognition and neuropsychiatric disorders. *Glia* 61, 62–70. <https://doi.org/10.1002/glia.22372>
14. Bolhassani, A., 2011. Potential efficacy of cell-penetrating peptides for nucleic acid and drug delivery in cancer. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Rev. Cancer* 1816, 232–246. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2011.07.006>
15. Borek, B., Nowicka, J., Gzik, A., Dziegielelewski, M., Jedrzejczak, K., Brzezinska, J., Grzybowski, M., Stanczak, P., Pomper, P., Zagodzdon, A., Rejczak, T., Matyszewski, K., Golebiowski, A., Olczak, J., Lisiecki, K., Tyszkiewicz, M., Kania, M., Piasecka, S., Cabaj, A., Dera, P., Mulewski, K., Chrzanowski, J., Kusmirek, D., Sobolewska, E., Magdycz, M., Mucha, L., Masnyk, M., Golab, J., Nowotny, M., Nowak, E., Napiorkowska-Gromadzka, A., Pikul, S., Jazwiec, R., Dzwonek, K., Dobrzanski, P., Meyring, M., Skowronek, K., Iwanowski, P., Zaslona, Z., Blaszczyk, R., 2023. Arginase 1/2 Inhibitor OATD-02: From Discovery to First-in-man Setup in Cancer Immunotherapy. *Mol. Cancer Ther.* 22, 807–817. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-22-0721>
16. Buga, G.M., Wei, L.H., Bauer, P.M., Fukuto, J.M., Ignarro, L.J., 1998. N^G -hydroxy- L -arginine and nitric oxide inhibit Caco-2 tumor cell proliferation by distinct mechanisms. *Am. J. Physiol.-Regul. Integr. Comp. Physiol.* 275, R1256–R1264. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.1998.275.4.R1256>
17. Chakraborty, G., Jain, S., Kundu, G.C., 2008. Osteopontin Promotes Vascular Endothelial Growth Factor–Dependent Breast Tumor Growth and Angiogenesis via Autocrine and Paracrine Mechanisms. *Cancer Res.* 68, 152–161. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-2126>
18. Chen, Z., Deng, Zhao, Tao, 2012. Cyclic RGD peptide-modified liposomal drug delivery system: enhanced cellular uptake in vitro and improved pharmacokinetics in rats. *Int. J. Nanomedicine* 3803. <https://doi.org/10.2147/IJN.S33541>
19. Choi, B.D., Gerstner, E.R., Frigault, M.J., Leick, M.B., Mount, C.W., Balaj, L., Nikiforow, S., Carter, B.S., Curry, W.T., Gallagher, K., Maus, M.V., 2024. Intraventricular CARv3-TEAM-E T Cells in Recurrent Glioblastoma. *N. Engl. J. Med.* 390, 1290–1298. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2314390>
20. Claus, E.B., Walsh, K.M., Wiencke, J.K., Molinaro, A.M., Wiemels, J.L., Schildkraut, J.M., Bondy, M.L., Berger, M., Jenkins, R., Wrensch, M., 2015. Survival and low-grade glioma: the emergence of genetic information. *Neurosurg. Focus* 38, E6. <https://doi.org/10.3171/2014.10.FOCUS12367>
21. Collins, V.P., 2004. Brain tumours: classification and genes. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 75, ii2–ii11. <https://doi.org/10.1136/jnnp.2004.040337>
22. Costa, H., Xu, X., Overbeek, G., Vasaikar, S., Patro, C.P.K., Kostopoulou, O.N., Jung, M., Shafi, G., Ananthaseshan, S., Tsiaras, G., Davoudi, B., Mohammad, A.-A., Lam, H., Strååt, K., Wilhelmi, V., Shang, M., Tegner, J., Tong, J.C., Wong, K.T., Söderberg-Naucler, C., Yaiw, K.-C., 2016. *Human cytomegalovirus*

- may promote tumour progression by upregulating arginase-2. *Oncotarget* 7, 47221–47231. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.9722>
23. Craik, D.J., Fairlie, D.P., Liras, S., Price, D., 2013. The Future of Peptide-based Drugs. *Chem. Biol. Drug Des.* 81, 136–147. <https://doi.org/10.1111/cbdd.12055>
 24. Crane, C.A., Ahn, B.J., Han, S.J., Parsa, A.T., 2012. Soluble factors secreted by glioblastoma cell lines facilitate recruitment, survival, and expansion of regulatory T cells: implications for immunotherapy. *Neuro-Oncol.* 14, 584–595. <https://doi.org/10.1093/neuonc/nos014>
 25. De Leo, A., Ugolini, A., Veglia, F., 2020. Myeloid Cells in Glioblastoma Microenvironment. *Cells* 10, 18. <https://doi.org/10.3390/cells10010018>
 26. Djamel-Eddine, Y.-C., De Witte, O., Mélot, C., Lefranc, F., 2019. Recurrent glioblastomas: Should we operate a second and even a third time? *Interdiscip. Neurosurg.* 18, 100551. <https://doi.org/10.1016/j.inat.2019.100551>
 27. Du, X., Jiang, T., Sheng, X., Gao, R., Li, Q., 2009. Inhibition of osteopontin suppresses in vitro and in vivo angiogenesis in endometrial cancer. *Gynecol. Oncol.* 115, 371–376. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2009.08.029>
 28. Ellert-Miklaszewska, A., Pasierbinska, M., Poleszak, K., Kamińska, B., 2018. Molecular interactions between tumor and its microenvironment in malignant gliomas. *Postepy Biochem.* 64, 129–140. https://doi.org/10.18388/pb.2018_123
 29. Ellert-Miklaszewska, A., Wisniewski, P., Kijewska, M., Gajdanowicz, P., Pszczolkowska, D., Przanowski, P., Dabrowski, M., Maleszewska, M., Kaminska, B., 2016a. Tumour-processed osteopontin and lactadherin drive the protumorigenic reprogramming of microglia and glioma progression. *Oncogene* 35, 6366–6377. <https://doi.org/10.1038/onc.2016.55>
 30. Ellert-Miklaszewska, A., Wisniewski, P., Kijewska, M., Gajdanowicz, P., Pszczolkowska, D., Przanowski, P., Dabrowski, M., Maleszewska, M., Kaminska, B., 2016b. Tumour-processed osteopontin and lactadherin drive the protumorigenic reprogramming of microglia and glioma progression. *Oncogene* 35, 6366–6377. <https://doi.org/10.1038/onc.2016.55>
 31. Ellert-Miklaszewska, A., Wisniewski, P., Kijewska, M., Gajdanowicz, P., Pszczolkowska, D., Przanowski, P., Dabrowski, M., Maleszewska, M., Kaminska, B., 2016c. Tumour-processed osteopontin and lactadherin drive the protumorigenic reprogramming of microglia and glioma progression. *Oncogene* 35, 6366–6377. <https://doi.org/10.1038/onc.2016.55>
 32. Fairweather, D., Cihakova, D., 2009. Alternatively activated macrophages in infection and autoimmunity. *J. Autoimmun.* 33, 222–230. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2009.09.012>
 33. Flores-Toro, J.A., Luo, D., Gopinath, A., Sarkisian, M.R., Campbell, J.J., Charo, I.F., Singh, R., Schall, T.J., Datta, M., Jain, R.K., Mitchell, D.A., Harrison, J.K., 2020a. CCR2 inhibition reduces tumor myeloid cells and unmasks a checkpoint inhibitor effect to slow progression of resistant murine gliomas. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 117, 1129–1138. <https://doi.org/10.1073/pnas.1910856117>
 34. Flores-Toro, J.A., Luo, D., Gopinath, A., Sarkisian, M.R., Campbell, J.J., Charo, I.F., Singh, R., Schall, T.J., Datta, M., Jain, R.K., Mitchell, D.A., Harrison, J.K., 2020b. CCR2 inhibition reduces tumor myeloid cells and unmasks a checkpoint inhibitor effect to slow progression of resistant murine gliomas. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 117, 1129–1138. <https://doi.org/10.1073/pnas.1910856117>

35. Friedmann-Morvinski, D., Bhargava, V., Gupta, S., Verma, I.M., Subramaniam, S., 2016. Identification of therapeutic targets for glioblastoma by network analysis. *Oncogene* 35, 608–620. <https://doi.org/10.1038/onc.2015.119>
36. Gabrilovich, D.I., Ostrand-Rosenberg, S., Bronte, V., 2012. Coordinated regulation of myeloid cells by tumours. *Nat. Rev. Immunol.* 12, 253–268. <https://doi.org/10.1038/nri3175>
37. Gabrusiewicz, K., Rodriguez, B., Wei, J., Hashimoto, Y., Healy, L.M., Maiti, S.N., Thomas, G., Zhou, S., Wang, Q., Elakkad, A., Liebelt, B.D., Yaghi, N.K., Ezhilarasan, R., Huang, N., Weinberg, J.S., Prabhu, S.S., Rao, G., Sawaya, R., Langford, L.A., Bruner, J.M., Fuller, G.N., Bar-Or, A., Li, W., Colen, R.R., Curran, M.A., Bhat, K.P., Antel, J.P., Cooper, L.J., Sulman, E.P., Heimberger, A.B., 2016. Glioblastoma-infiltrated innate immune cells resemble M0 macrophage phenotype. *JCI Insight* 1. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.85841>
38. Gaisford, S., 2012. Isothermal microcalorimetry for quantifying amorphous content in processed pharmaceuticals. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 64, 431–439. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2011.11.001>
39. Gieryng, A., Pszczolkowska, D., Walentynowicz, K.A., Rajan, W.D., Kaminska, B., 2017. Immune microenvironment of gliomas. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* 97, 498–518. <https://doi.org/10.1038/labinvest.2017.19>
40. Giles, B., Nakhjavani, M., Wiesa, A., Knight, T., Shigdar, S., Samarasinghe, R.M., 2023. Unravelling the Glioblastoma Tumour Microenvironment: Can Aptamer Targeted Delivery Become Successful in Treating Brain Cancers? *Cancers* 15, 4376. <https://doi.org/10.3390/cancers15174376>
41. Golubovskaya, V., Wu, L., 2016. Different Subsets of T Cells, Memory, Effector Functions, and CAR-T Immunotherapy. *Cancers* 8, 36. <https://doi.org/10.3390/cancers8030036>
42. Grossman, S.A., Ye, X., Piantadosi, S., Desideri, S., Nabors, L.B., Rosenfeld, M., Fisher, J., for the NABTT CNS Consortium, 2010. Survival of Patients with Newly Diagnosed Glioblastoma Treated with Radiation and Temozolomide in Research Studies in the United States. *Clin. Cancer Res.* 16, 2443–2449. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-09-3106>
43. Haddad, A.F., Young, J.S., Amara, D., Berger, M.S., Raleigh, D.R., Aghi, M.K., Butowski, N.A., 2021. Mouse models of glioblastoma for the evaluation of novel therapeutic strategies. *Neuro-Oncol. Adv.* 3, vdab100. <https://doi.org/10.1093/noajnl/vdab100>
44. Hambardzumyan, D., Gutmann, D.H., Kettenmann, H., 2016. The role of microglia and macrophages in glioma maintenance and progression. *Nat. Neurosci.* 19, 20–27. <https://doi.org/10.1038/nn.4185>
45. Han, S., Ma, E., Wang, X., Yu, C., Dong, T., Zhan, W., Wei, X., Liang, G., Feng, S., 2016. Rescuing defective tumor-infiltrating T-cell proliferation in glioblastoma patients. *Oncol. Lett.* 12, 2924–2929. <https://doi.org/10.3892/ol.2016.4944>
46. Hanisch, U.-K., Kettenmann, H., 2007. Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nat. Neurosci.* 10, 1387–1394. <https://doi.org/10.1038/nn1997>
47. Harris-Bookman, S., Mathios, D., Martin, A.M., Xia, Y., Kim, E., Xu, H., Belcaid, Z., Polanczyk, M., Barberi, T., Theodros, D., Kim, J., Taube, J.M., Burger, P.C., Selby, M., Taitt, C., Korman, A., Ye, X., Drake, C.G., Brem, H., Pardoll, D.M., Lim, M., 2018. Expression of LAG-3 and efficacy of combination

- treatment with anti-LAG-3 and anti-PD-1 monoclonal antibodies in glioblastoma. *Int. J. Cancer* 143, 3201–3208. <https://doi.org/10.1002/ijc.31661>
48. Hirata, A., Hashimoto, H., Shibasaki, C., Narumi, K., Aoki, K., 2019. Intratumoral IFN- α gene delivery reduces tumor-infiltrating regulatory T cells through the downregulation of tumor CCL17 expression. *Cancer Gene Ther.* 26, 334–343. <https://doi.org/10.1038/s41417-018-0059-5>
 49. Hoffman, J.A., Giraudo, E., Singh, M., Zhang, L., Inoue, M., Porkka, K., Hanahan, D., Ruoslahti, E., 2003. Progressive vascular changes in a transgenic mouse model of squamous cell carcinoma. *Cancer Cell* 4, 383–391. [https://doi.org/10.1016/S1535-6108\(03\)00273-3](https://doi.org/10.1016/S1535-6108(03)00273-3)
 50. Hu, C., Yang, J., Qi, Z., Wu, H., Wang, B., Zou, F., Mei, H., Liu, J., Wang, W., Liu, Q., 2022. Heat shock proteins: Biological functions, pathological roles, and therapeutic opportunities. *MedComm* 3, e161. <https://doi.org/10.1002/mco2.161>
 51. Hu, Q., Gao, X., Gu, G., Kang, T., Tu, Y., Liu, Z., Song, Q., Yao, L., Pang, Z., Jiang, X., Chen, H., Chen, J., 2013. Glioma therapy using tumor homing and penetrating peptide-functionalized PEG–PLA nanoparticles loaded with paclitaxel. *Biomaterials* 34, 5640–5650. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.04.025>
 52. Jacobs, J.F.M., Idema, A.J., Bol, K.F., Grotenhuis, J.A., De Vries, I.J.M., Wesseling, P., Adema, G.J., 2010. Prognostic significance and mechanism of Treg infiltration in human brain tumors. *J. Neuroimmunol.* 225, 195–199. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2010.05.020>
 53. Jain, K.K., 2018. A Critical Overview of Targeted Therapies for Glioblastoma. *Front. Oncol.* 8, 419. <https://doi.org/10.3389/fonc.2018.00419>
 54. Kapoor, P., Singh, H., Gautam, A., Chaudhary, K., Kumar, R., Raghava, G.P.S., 2012. TumorHoPe: A Database of Tumor Homing Peptides. *PLoS ONE* 7, e35187. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035187>
 55. Katsamakos, S., Chatzisideri, T., Thysiadis, S., Sarli, V., 2017. Rgd-Mediated Delivery of Small-Molecule Drugs. *Future Med. Chem.* 9, 579–604. <https://doi.org/10.4155/fmc-2017-0008>
 56. Keir, M., Francisco, L., Sharpe, A., 2007. PD-1 and its ligands in T-cell immunity. *Curr. Opin. Immunol.* 19, 309–314. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2007.04.012>
 57. Kierdorf, K., Erny, D., Goldmann, T., Sander, V., Schulz, C., Perdiguero, E.G., Wieghofer, P., Heinrich, A., Riemke, P., Hölscher, C., Müller, D.N., Luckow, B., Brouwer, T., Debowski, K., Fritz, G., Opdenakker, G., Diefenbach, A., Biber, K., Heikenwalder, M., Geissmann, F., Rosenbauer, F., Prinz, M., 2013. Microglia emerge from erythromyeloid precursors via Pu.1- and Irf8-dependent pathways. *Nat. Neurosci.* 16, 273–280. <https://doi.org/10.1038/nn.3318>
 58. Kijewska, M., Kocyk, M., Kloss, M., Stepniak, K., Korwek, Z., Polakowska, R., Dabrowski, M., Gierzyng, A., Wojtas, B., Ciechomska, I.A., Kaminska, B., 2017. The embryonic type of *SPP1* transcriptional regulation is re-activated in glioblastoma. *Oncotarget* 8, 16340–16355. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.14092>
 59. Kim, J.E., Patel, M.A., Mangraviti, A., Kim, E.S., Theodoros, D., Velarde, E., Liu, A., Sankey, E.W., Tam, A., Xu, H., Mathios, D., Jackson, C.M., Harris-Bookman, S., Garzon-Muvdi, T., Sheu, M., Martin, A.M., Tyler, B.M., Tran, P.T., Ye, X., Olivi, A., Taube, J.M., Burger, P.C., Drake, C.G., Brem, H., Pardoll, D.M., Lim, M., 2017. Combination Therapy with Anti-PD-1, Anti-TIM-3, and

- Focal Radiation Results in Regression of Murine Gliomas. *Clin. Cancer Res.* 23, 124–136. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-15-1535>
60. Kmiecik, J., Poli, A., Brons, N.H.C., Waha, A., Eide, G.E., Enger, P.Ø., Zimmer, J., Chekenya, M., 2013. Elevated CD3+ and CD8+ tumor-infiltrating immune cells correlate with prolonged survival in glioblastoma patients despite integrated immunosuppressive mechanisms in the tumor microenvironment and at the systemic level. *J. Neuroimmunol.* 264, 71–83. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2013.08.013>
 61. Krämer, B., Schulte, D., Körner, C., Zwank, C., Hartmann, A., Michalk, M., Söhne, J., Langhans, B., Nischalke, H., Coenen, M., Möhl, C., Vogt, A., Hennenberg, M., Sauerbruch, T., Spengler, U., Nattermann, J., 2009. Regulation of NK cell trafficking by CD81. *Eur. J. Immunol.* 39, 3447–3458. <https://doi.org/10.1002/eji.200939234>
 62. Kranjc, M.K., Novak, M., Pestell, R.G., Lah, T.T., 2019. Cytokine CCL5 and receptor CCR5 axis in glioblastoma multiforme. *Radiol. Oncol.* 53, 397–406. <https://doi.org/10.2478/raon-2019-0057>
 63. Kumar, V., Patel, S., Tcyganov, E., Gabrilovich, D.I., 2016. The Nature of Myeloid-Derived Suppressor Cells in the Tumor Microenvironment. *Trends Immunol.* 37, 208–220. <https://doi.org/10.1016/j.it.2016.01.004>
 64. Kurozumi, K., Ichikawa, T., Onishi, M., Fujii, K., Date, I., 2012. Cilengitide Treatment for Malignant Glioma: Current Status and Future Direction. *Neurol. Med. Chir. (Tokyo)* 52, 539–547. <https://doi.org/10.2176/nmc.52.539>
 65. Lamas, B., Vergnaud-Gauduchon, J., Goncalves-Mendes, N., Perche, O., Rossary, A., Vasson, M.-P., Farges, M.-C., 2012. Altered functions of natural killer cells in response to L-Arginine availability. *Cell. Immunol.* 280, 182–190. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2012.11.018>
 66. Lamour, V., Le Mercier, M., Lefranc, F., Hagedorn, M., Javerzat, S., Bikfalvi, A., Kiss, R., Castronovo, V., Bellahcène, A., 2010. Selective osteopontin knockdown exerts anti-tumoral activity in a human glioblastoma model. *Int. J. Cancer* 126, 1797–1805. <https://doi.org/10.1002/ijc.24751>
 67. Lee, A.H., Sun, L., Mochizuki, A.Y., Reynoso, J.G., Orpilla, J., Chow, F., Kienzler, J.C., Everson, R.G., Nathanson, D.A., Bensinger, S.J., Liao, L.M., Cloughesy, T., Hugo, W., Prins, R.M., 2021. Neoadjuvant PD-1 blockade induces T cell and cDC1 activation but fails to overcome the immunosuppressive tumor associated macrophages in recurrent glioblastoma. *Nat. Commun.* 12, 6938. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-26940-2>
 68. Li, S., Zhang, Q., Hong, Y., 2020. Tumor Vessel Normalization: A Window to Enhancing Cancer Immunotherapy. *Technol. Cancer Res. Treat.* 19, 1533033820980116. <https://doi.org/10.1177/1533033820980116>
 69. Lin, C., Wang, N., Xu, C., 2023. Glioma-associated microglia/macrophages (GAMs) in glioblastoma: Immune function in the tumor microenvironment and implications for immunotherapy. *Front. Immunol.* 14, 1123853. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1123853>
 70. Lin, H., Liu, C., Hu, A., Zhang, D., Yang, H., Mao, Y., 2024. Understanding the immunosuppressive microenvironment of glioma: mechanistic insights and clinical perspectives. *J. Hematol. Oncol.* 17, 31. <https://doi.org/10.1186/s13045-024-01544-7>

71. Liu, H., Chen, A., Guo, F., Yuan, L., 2010. A short-hairpin RNA targeting osteopontin downregulates MMP-2 and MMP-9 expressions in prostate cancer PC-3 cells. *Cancer Lett.* 295, 27–37. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2010.02.012>
72. Liu, Y., Zhou, F., Ali, H., Lathia, J.D., Chen, P., 2024. Immunotherapy for glioblastoma: current state, challenges, and future perspectives. *Cell. Mol. Immunol.* <https://doi.org/10.1038/s41423-024-01226-x>
73. Lowe, M.M., Boothby, I., Clancy, S., Ahn, R.S., Liao, W., Nguyen, D.N., Schumann, K., Marson, A., Mahuron, K.M., Kingsbury, G.A., Liu, Z., Munoz Sandoval, P., Rodriguez, R.S., Pauli, M.L., Taravati, K., Arron, S.T., Neuhaus, I.M., Harris, H.W., Kim, E.A., Shin, U.S., Krummel, M.F., Daud, A., Scharschmidt, T.C., Rosenblum, M.D., 2019. Regulatory T cells use arginase 2 to enhance their metabolic fitness in tissues. *JCI Insight* 4, e129756. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.129756>
74. Lucas, J., Hsieh, T.-C., Halicka, H.D., Darzynkiewicz, Z., Wu, J., 2018. Upregulation of PD-L1 expression by resveratrol and piceatannol in breast and colorectal cancer cells occurs via HDAC3/p300-mediated NF- κ B signaling. *Int. J. Oncol.* <https://doi.org/10.3892/ijo.2018.4512>
75. Mackiewicz, J., Mackiewicz, A., 2010. Immunotherapy of cancer and perspectives of its development. *Współczesna Onkol.* 2, 59–71. <https://doi.org/10.5114/wo.2010.13914>
76. Malesa, A., Nowak, J., Skórka, K., Karp, M., Giannopoulos, K., 2018. Immunoterapia z użyciem przeciwciał monoklonalnych ukierunkowanych na szlak PD-1/PD-L1 w chorobach nowotworowych: Monoclonal antibodies against PD-1/PD-L1 pathway. *Acta Haematol. Pol.* 49, 207–227. <https://doi.org/10.2478/ahp-2018-0025>
77. Mantovani, A., Bonecchi, R., Locati, M., 2006. Tuning inflammation and immunity by chemokine sequestration: decoys and more. *Nat. Rev. Immunol.* 6, 907–918. <https://doi.org/10.1038/nri1964>
78. Mantovani, A., Sica, A., 2010. Macrophages, innate immunity and cancer: balance, tolerance, and diversity. *Curr. Opin. Immunol.* 22, 231–237. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2010.01.009>
79. Martinez, F.O., Gordon, S., 2014. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Rep.* 6. <https://doi.org/10.12703/P6-13>
80. Marvel, D., Gabrilovich, D.I., 2015. Myeloid-derived suppressor cells in the tumor microenvironment: expect the unexpected. *J. Clin. Invest.* 125, 3356–3364. <https://doi.org/10.1172/JCI80005>
81. Mina-Osorio, P., Winnicka, B., O’Conor, C., Grant, C.L., Vogel, L.K., Rodriguez-Pinto, D., Holmes, K.V., Ortega, E., Shapiro, L.H., 2008. CD13 is a novel mediator of monocytic/endothelial cell adhesion. *J. Leukoc. Biol.* 84, 448–459. <https://doi.org/10.1189/jlb.1107802>
82. Mita, Y., Kimura, M.Y., Hayashizaki, K., Koyama-Nasu, R., Ito, T., Motohashi, S., Okamoto, Y., Nakayama, T., 2018. Crucial role of CD69 in anti-tumor immunity through regulating the exhaustion of tumor-infiltrating T cells. *Int. Immunol.* 30, 559–567. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxy050>
83. Morris Jr, S.M., 2009. Recent advances in arginine metabolism: roles and regulation of the arginases. *Br. J. Pharmacol.* 157, 922–930. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2009.00278.x>

84. Munder, M., 2006. Suppression of T-cell functions by human granulocyte arginase. *Blood* 108, 1627–1634. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-11-010389>
85. Munder, M., Engelhardt, M., Knies, D., Medenhoff, S., Wabnitz, G., Luckner-Minden, C., Feldmeyer, N., Voss, R.-H., Kropf, P., Müller, I., Conradi, R., Samstag, Y., Theobald, M., Ho, A.D., Goldschmidt, H., Hundemer, M., 2013. Cytotoxicity of Tumor Antigen Specific Human T Cells Is Unimpaired by Arginine Depletion. *PLoS ONE* 8, e63521. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063521>
86. Murray, P.J., Wynn, T.A., 2011. Obstacles and opportunities for understanding macrophage polarization. *J. Leukoc. Biol.* 89, 557–563. <https://doi.org/10.1189/jlb.0710409>
87. Ngiow, S.F., Von Scheidt, B., Akiba, H., Yagita, H., Teng, M.W.L., Smyth, M.J., 2011. Anti-TIM3 Antibody Promotes T Cell IFN- γ -Mediated Antitumor Immunity and Suppresses Established Tumors. *Cancer Res.* 71, 3540–3551. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-0096>
88. Niesel, K., Schulz, M., Anthes, J., Alekseeva, T., Macas, J., Salamero-Boix, A., Möckl, A., Oberwahrenbrock, T., Lölies, M., Stein, S., Plate, K.H., Reiss, Y., Rödel, F., Sevenich, L., 2021. The immune suppressive microenvironment affects efficacy of radio-immunotherapy in brain metastasis. *EMBO Mol. Med.* 13, e13412. <https://doi.org/10.15252/emmm.202013412>
89. Nishino, M., 2016. Immune-related response evaluations during immune-checkpoint inhibitor therapy: establishing a “common language” for the new arena of cancer treatment. *J. Immunother. Cancer* 4, 30. <https://doi.org/10.1186/s40425-016-0134-0>
90. Niu, F., Yu, Y., Li, Zhuozhuo, Ren, Y., Li, Zi, Ye, Q., Liu, P., Ji, C., Qian, L., Xiong, Y., 2022. Arginase: An emerging and promising therapeutic target for cancer treatment. *Biomed. Pharmacother.* 149, 112840. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.112840>
91. Noorani, I., De La Rosa, J., 2023. Breaking barriers for glioblastoma with a path to enhanced drug delivery. *Nat. Commun.* 14, 5909. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-41694-9>
92. Ochocka, N., Segit, P., Walentynowicz, K.A., Wojnicki, K., Cyranowski, S., Swatler, J., Mieczkowski, J., Kaminska, B., 2021. Single-cell RNA sequencing reveals functional heterogeneity of glioma-associated brain macrophages. *Nat. Commun.* 12, 1151. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-21407-w>
93. Ochocka, N., Segit, P., Wojnicki, K., Cyranowski, S., Swatler, J., Jacek, K., Grajkowska, W., Kaminska, B., 2023. Specialized functions and sexual dimorphism explain the functional diversity of the myeloid populations during glioma progression. *Cell Rep.* 42, 111971. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.111971>
94. Oh, T., Fakurnejad, S., Sayegh, E.T., Clark, A.J., Ivan, M.E., Sun, M.Z., Safaee, M., Bloch, O., James, C.D., Parsa, A.T., 2014. Immunocompetent murine models for the study of glioblastoma immunotherapy. *J. Transl. Med.* 12, 107. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-12-107>
95. Ostrom, Q.T., Patil, N., Cioffi, G., Waite, K., Kruchko, C., Barnholtz-Sloan, J.S., 2020. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2013–2017. *Neuro-Oncol.* 22, iv1–iv96. <https://doi.org/10.1093/neuonc/noaa200>

96. Papaioannou, N.E., Beniata, O.V., Vitsos, P., Tsitsilonis, O., Samara, P., 2016. Harnessing the immune system to improve cancer therapy. *Ann. Transl. Med.* 4, 261–261. <https://doi.org/10.21037/atm.2016.04.01>
97. Pardoll, D., Drake, C., 2012. Immunotherapy earns its spot in the ranks of cancer therapy. *J. Exp. Med.* 209, 201–209. <https://doi.org/10.1084/jem.20112275>
98. Pearson, J.R.D., Cuzzubbo, S., McArthur, S., Durrant, L.G., Adhikaree, J., Tinsley, C.J., Pockley, A.G., McArdle, S.E.B., 2020. Immune Escape in Glioblastoma Multiforme and the Adaptation of Immunotherapies for Treatment. *Front. Immunol.* 11, 582106. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.582106>
99. Pianko, M.J., Liu, Y., Bagchi, S., Lesokhin, A.M., 2017. Immune checkpoint blockade for hematologic malignancies: a review. *Stem Cell Investig.* 4, 32–32. <https://doi.org/10.21037/sci.2017.03.04>
100. Przystal, J.M., Becker, H., Canjuga, D., Tsiami, F., Anderle, N., Keller, A.-L., Pohl, A., Ries, C.H., Schmittnaegel, M., Korinetska, N., Koch, M., Schittenhelm, J., Tatagiba, M., Schmees, C., Beck, S.C., Tabatabai, G., 2021. Targeting CSF1R Alone or in Combination with PD1 in Experimental Glioma. *Cancers* 13, 2400. <https://doi.org/10.3390/cancers13102400>
101. Pyonteck, S.M., Akkari, L., Schuhmacher, A.J., Bowman, R.L., Sevenich, L., Quail, D.F., Olson, O.C., Quick, M.L., Huse, J.T., Teijeiro, V., Setty, M., Leslie, C.S., Oei, Y., Pedraza, A., Zhang, J., Brennan, C.W., Sutton, J.C., Holland, E.C., Daniel, D., Joyce, J.A., 2013. CSF-1R inhibition alters macrophage polarization and blocks glioma progression. *Nat. Med.* 19, 1264–1272. <https://doi.org/10.1038/nm.3337>
102. Riella, L.V., Paterson, A.M., Sharpe, A.H., Chandraker, A., 2012. Role of the PD-1 Pathway in the Immune Response. *Am. J. Transplant.* 12, 2575–2587. <https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2012.04224.x>
103. Riley, J.L., 2009. PD-1 signaling in primary T cells. *Immunol. Rev.* 229, 114–125. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2009.00767.x>
104. Rzepka, Z., Knapik, M., Wrześniok, D., 2019. Strategies of current cancer immunotherapy. *Postępy Hig. Med. Dośw.* 73, 898–908. <https://doi.org/10.5604/01.3001.0013.7539>
105. Sarantopoulos, A., Ene, C., Aquilanti, E., 2024. Therapeutic approaches to modulate the immune microenvironment in gliomas. *Npj Precis. Oncol.* 8, 241. <https://doi.org/10.1038/s41698-024-00717-4>
106. Sharma, P., Aaroe, A., Liang, J., Puduvalli, V.K., 2023. Tumor microenvironment in glioblastoma: Current and emerging concepts. *Neuro-Oncol. Adv.* 5, vdad009. <https://doi.org/10.1093/noajnl/vdad009>
107. Shelton, L.M., Mukherjee, P., Huysentruyt, L.C., Urits, I., Rosenberg, J.A., Seyfried, T.N., 2010. A novel pre-clinical in vivo mouse model for malignant brain tumor growth and invasion. *J. Neurooncol.* 99, 165–176. <https://doi.org/10.1007/s11060-010-0115-y>
108. Sica, A., Mantovani, A., 2012. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *J. Clin. Invest.* 122, 787–795. <https://doi.org/10.1172/JCI59643>
109. Singh, R., Pervin, S., Karimi, A., Cederbaum, S., Chaudhuri, G., 2000. Arginase activity in human breast cancer cell lines: N(omega)-hydroxy-L-arginine selectively inhibits cell proliferation and induces apoptosis in MDA-MB-468 cells. *Cancer Res.* 60, 3305–3312.
110. Sippel, T.R., White, J., Nag, K., Tsvankin, V., Klaassen, M., Kleinschmidt-DeMasters, B.K., Waziri, A., 2011. Neutrophil Degranulation and

- Immunosuppression in Patients with GBM: Restoration of Cellular Immune Function by Targeting Arginase I. *Clin. Cancer Res.* 17, 6992–7002. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-11-1107>
111. Spranger, S., Gajewski, T., 2013. Rational combinations of immunotherapeutics that target discrete pathways. *J. Immunother. Cancer* 1, 16. <https://doi.org/10.1186/2051-1426-1-16>
 112. Steggerda, S.M., Bennett, M.K., Chen, J., Emberley, E., Huang, T., Janes, J.R., Li, W., MacKinnon, A.L., Makkouk, A., Marguier, G., Murray, P.J., Neou, S., Pan, A., Parlati, F., Rodriguez, M.L.M., Van De Velde, L.-A., Wang, T., Works, M., Zhang, J., Zhang, W., Gross, M.I., 2017. Inhibition of arginase by CB-1158 blocks myeloid cell-mediated immune suppression in the tumor microenvironment. *J. Immunother. Cancer* 5, 101. <https://doi.org/10.1186/s40425-017-0308-4>
 113. Stoll, A., Bruns, H., Fuchs, M., Völkl, S., Nimmerjahn, F., Kunz, M., Peipp, M., Mackensen, A., Mougiakakos, D., 2021. CD137 (4-1BB) stimulation leads to metabolic and functional reprogramming of human monocytes/macrophages enhancing their tumoricidal activity. *Leukemia* 35, 3482–3496. <https://doi.org/10.1038/s41375-021-01287-1>
 114. Stupp, R., Hegi, M.E., Neyns, B., Goldbrunner, R., Schlegel, U., Clement, P.M.J., Grabenbauer, G.G., Ochsenbein, A.F., Simon, M., Dietrich, P.-Y., Pietsch, T., Hicking, C., Tonn, J.-C., Diserens, A.-C., Pica, A., Hermisson, M., Krueger, S., Picard, M., Weller, M., 2010. Phase I/IIa Study of Cilengitide and Temozolomide With Concomitant Radiotherapy Followed by Cilengitide and Temozolomide Maintenance Therapy in Patients With Newly Diagnosed Glioblastoma. *J. Clin. Oncol.* 28, 2712–2718. <https://doi.org/10.1200/JCO.2009.26.6650>
 115. Stupp, R., Mason, W.P., Van Den Bent, M.J., Weller, M., Fisher, B., Taphoorn, M.J.B., Belanger, K., Brandes, A.A., Marosi, C., Bogdahn, U., Curschmann, J., Janzer, R.C., Ludwin, S.K., Gorlia, T., Allgeier, A., Lacombe, D., Cairncross, J.G., Eisenhauer, E., Mirimanoff, R.O., 2005. Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma. *N. Engl. J. Med.* 352, 987–996. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa043330>
 116. Szatmári, T., Lumniczky, K., Désaknai, S., Trajcevski, S., Hídvégi, E.J., Hamada, H., Sáfrány, G., 2006. Detailed characterization of the mouse glioma 261 tumor model for experimental glioblastoma therapy. *Cancer Sci.* 97, 546–553. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2006.00208.x>
 117. Szulzewsky, F., Pelz, A., Feng, X., Synowitz, M., Markovic, D., Langmann, T., Holtman, I.R., Wang, X., Eggen, B.J.L., Boddeke, H.W.G.M., Hambardzumyan, D., Wolf, S.A., Kettenmann, H., 2015. Glioma-Associated Microglia/Macrophages Display an Expression Profile Different from M1 and M2 Polarization and Highly Express Gpnmb and Spp1. *PLOS ONE* 10, e0116644. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0116644>
 118. Tanaka, A., Sakaguchi, S., 2017. Regulatory T cells in cancer immunotherapy. *Cell Res.* 27, 109–118. <https://doi.org/10.1038/cr.2016.151>
 119. Taube, J.M., Anders, R.A., Young, G.D., Xu, H., Sharma, R., McMiller, T.L., Chen, S., Klein, A.P., Pardoll, D.M., Topalian, S.L., Chen, L., 2012. Colocalization of Inflammatory Response with B7-H1 Expression in Human Melanocytic Lesions Supports an Adaptive Resistance Mechanism of Immune Escape. *Sci. Transl. Med.* 4. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3003689>

120. Tran, B., Rosenthal, M.A., 2010. Survival comparison between glioblastoma multiforme and other incurable cancers. *J. Clin. Neurosci.* 17, 417–421. <https://doi.org/10.1016/j.jocn.2009.09.004>
121. Tripathy, D.K., Panda, L.P., Biswal, S., Barhwal, K., 2024. Insights into the glioblastoma tumor microenvironment: current and emerging therapeutic approaches. *Front. Pharmacol.* 15, 1355242. <https://doi.org/10.3389/fphar.2024.1355242>
122. Tucci, M., Stucci, S., Silvestris, F., 2014. Does cilengitide deserve another chance? *Lancet Oncol.* 15, e584–e585. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(14\)70462-0](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(14)70462-0)
123. Vadevoo, S.M.P., Gurung, S., Lee, H.-S., Gunassekaran, G.R., Lee, S.-M., Yoon, J.-W., Lee, Y.-K., Lee, B., 2023. Peptides as multifunctional players in cancer therapy. *Exp. Mol. Med.* 55, 1099–1109. <https://doi.org/10.1038/s12276-023-01016-x>
124. Van Hove, H., Martens, L., Scheyltjens, I., De Vlaminck, K., Pombo Antunes, A.R., De Prijck, S., Vandamme, N., De Schepper, S., Van Isterdael, G., Scott, C.L., Aerts, J., Berx, G., Boeckxstaens, G.E., Vandenbroucke, R.E., Vereecke, L., Moechars, D., Guillems, M., Van Ginderachter, J.A., Saeys, Y., Movahedi, K., 2019. A single-cell atlas of mouse brain macrophages reveals unique transcriptional identities shaped by ontogeny and tissue environment. *Nat. Neurosci.* 22, 1021–1035. <https://doi.org/10.1038/s41593-019-0393-4>
125. Van Solinge, T.S., Nieland, L., Chiocca, E.A., Broekman, M.L.D., 2022. Advances in local therapy for glioblastoma — taking the fight to the tumour. *Nat. Rev. Neurol.* 18, 221–236. <https://doi.org/10.1038/s41582-022-00621-0>
126. Vivès, E., Schmidt, J., Pèlerin, A., 2008. Cell-penetrating and cell-targeting peptides in drug delivery. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Rev. Cancer* 1786, 126–138. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2008.03.001>
127. Wainwright, D.A., Dey, M., Chang, A., Lesniak, M.S., 2013. Targeting Tregs in Malignant Brain Cancer: Overcoming IDO. *Front. Immunol.* 4. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00116>
128. Walentynowicz, K.A., Ochocka, N., Pasierbinska, M., Wojnicki, K., Stepniak, K., Mieczkowski, J., Ciechomska, I.A., Kaminska, B., 2018. In Search for Reliable Markers of Glioma-Induced Polarization of Microglia. *Front. Immunol.* 9, 1329. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01329>
129. Wang, D., Wang, C., Wang, L., Chen, Y., 2019. A comprehensive review in improving delivery of small-molecule chemotherapeutic agents overcoming the blood-brain/brain tumor barriers for glioblastoma treatment. *Drug Deliv.* 26, 551–565. <https://doi.org/10.1080/10717544.2019.1616235>
130. Wang, H., Yang, J., Li, X., Zhao, H., 2024. Current state of immune checkpoints therapy for glioblastoma. *Heliyon* 10, e24729. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e24729>
131. Wang, S., Blois, A., El Rayes, T., Liu, J.F., Hirsch, M.S., Grøvdal, K., Palakurthi, S., Bielenberg, D.R., Akslen, L.A., Drapkin, R., Mittal, V., Watnick, R.S., 2016. Development of a prosaposin-derived therapeutic cyclic peptide that targets ovarian cancer via the tumor microenvironment. *Sci. Transl. Med.* 8. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aad5653>
132. Wang, Y., Li, J., Nakahata, S., Iha, H., 2024. Complex Role of Regulatory T Cells (Tregs) in the Tumor Microenvironment: Their Molecular Mechanisms and

- Bidirectional Effects on Cancer Progression. *Int. J. Mol. Sci.* 25, 7346. <https://doi.org/10.3390/ijms25137346>
133. Waziri, A., Killory, B., Ogden, A.T., Canoll, P., Anderson, R.C.E., Kent, S.C., Anderson, D.E., Bruce, J.N., 2008. Preferential In Situ CD4+CD56+ T Cell Activation and Expansion within Human Glioblastoma. *J. Immunol.* 180, 7673–7680. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.11.7673>
 134. Weekes, C.D., Rosen, L.S., Capasso, A., Wong, K.M., Ye, W., Anderson, M., McCall, B., Fredrickson, J., Wakshull, E., Eppler, S., Shon-Nguyen, Q., Desai, R., Huseni, M., Hegde, P.S., Pourmohamad, T., Rhee, I., Bessudo, A., 2018. Phase I study of the anti- $\alpha 5\beta 1$ monoclonal antibody MINT1526A with or without bevacizumab in patients with advanced solid tumors. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 82, 339–351. <https://doi.org/10.1007/s00280-018-3622-8>
 135. Wei, J., Marisetty, A., Schrand, B., Gabrusiewicz, K., Hashimoto, Y., Ott, M., Grami, Z., Kong, L.-Y., Ling, X., Caruso, H., Zhou, S., Wang, Y.A., Fuller, G.N., Huse, J., Gilboa, E., Kang, N., Huang, X., Verhaak, R., Li, S., Heimberger, A.B., 2018a. Osteopontin mediates glioblastoma-associated macrophage infiltration and is a potential therapeutic target. *J. Clin. Invest.* 129, 137–149. <https://doi.org/10.1172/JCI121266>
 136. Wei, J., Marisetty, A., Schrand, B., Gabrusiewicz, K., Hashimoto, Y., Ott, M., Grami, Z., Kong, L.-Y., Ling, X., Caruso, H., Zhou, S., Wang, Y.A., Fuller, G.N., Huse, J., Gilboa, E., Kang, N., Huang, X., Verhaak, R., Li, S., Heimberger, A.B., 2018b. Osteopontin mediates glioblastoma-associated macrophage infiltration and is a potential therapeutic target. *J. Clin. Invest.* 129, 137–149. <https://doi.org/10.1172/JCI121266>
 137. Weller, M., Nabors, L.B., Gorlia, T., Leske, H., Rushing, E., Bady, P., Hicking, C., Perry, J., Hong, Y.-K., Roth, P., Wick, W., Goodman, S.L., Hegi, M.E., Picard, M., Moch, H., Straub, J., Stupp, R., 2016. Cilengitide in newly diagnosed glioblastoma: biomarker expression and outcome. *Oncotarget* 7, 15018–15032. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.7588>
 138. Xia, C., Wang, Y., Liu, C., Wang, L., Gao, X., Li, D., Qi, W., An, R., Xu, H., 2020. Novel Peptide CM 7 Targeted c-Met with Antitumor Activity. *Molecules* 25, 451. <https://doi.org/10.3390/molecules25030451>
 139. Xiong, A., Zhang, J., Chen, Y., Zhang, Y., Yang, F., 2022. Integrated single-cell transcriptomic analyses reveal that GPNMB-high macrophages promote PN-MES transition and impede T cell activation in GBM. *eBioMedicine* 83, 104239. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2022.104239>
 140. Xiong, J., Balcioglu, H.E., Danen, E.H.J., 2013. Integrin signaling in control of tumor growth and progression. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 45, 1012–1015. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2013.02.005>
 141. Yamada, S., Bu, X.-Y., Khankaldyyan, V., Gonzales-Gomez, I., McComb, J.G., Laug, W.E., 2006. EFFECT OF THE ANGIOGENESIS INHIBITOR CILENGITIDE (EMD 121974) ON GLIOBLASTOMA GROWTH IN NUDE MICE. *Neurosurgery* 59, 1304–1312. <https://doi.org/10.1227/01.NEU.0000245622.70344.BE>
 142. Yamaguchi, Y., Shao, Z., Sharif, S., Du, X.-Y., Myles, T., Merchant, M., Harsh, G., Glantz, M., Recht, L., Morser, J., Leung, L.L.K., 2013. Thrombin-cleaved Fragments of Osteopontin Are Overexpressed in Malignant Glial Tumors and Provide a Molecular Niche with Survival Advantage. *J. Biol. Chem.* 288, 3097–3111. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.362954>

143. Yan, D., Kowal, J., Akkari, L., Schuhmacher, A.J., Huse, J.T., West, B.L., Joyce, J.A., 2017. Inhibition of colony stimulating factor-1 receptor abrogates microenvironment-mediated therapeutic resistance in gliomas. *Oncogene* 36, 6049–6058. <https://doi.org/10.1038/onc.2017.261>
144. Ye, Z., Ai, X., Zhao, L., Fei, F., Wang, P., Zhou, S., 2021. Phenotypic plasticity of myeloid cells in glioblastoma development, progression, and therapeutics. *Oncogene* 40, 6059–6070. <https://doi.org/10.1038/s41388-021-02010-1>
145. Yin, W., Li, Y., Song, Y., Zhang, J., Wu, C., Chen, Y., Miao, Y., Lin, C., Lin, Y., Yan, D., Chen, J., He, R., 2021. CCRL2 promotes antitumor T-cell immunity via amplifying TLR4-mediated immunostimulatory macrophage activation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 118, e2024171118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2024171118>
146. Yu-Ju Wu, C., Chen, C.-H., Lin, C.-Y., Feng, L.-Y., Lin, Y.-C., Wei, K.-C., Huang, C.-Y., Fang, J.-Y., Chen, P.-Y., 2020. CCL5 of glioma-associated microglia/macrophages regulates glioma migration and invasion via calcium-dependent matrix metalloproteinase 2. *Neuro-Oncol.* 22, 253–266. <https://doi.org/10.1093/neuonc/noz189>
147. Zamarron, B.F., Chen, W., 2011. Dual Roles of Immune Cells and Their Factors in Cancer Development and Progression. *Int. J. Biol. Sci.* 7, 651–658. <https://doi.org/10.7150/ijbs.7.651>
148. Zappasodi, R., Budhu, S., Hellmann, M.D., Postow, M.A., Senbabaoglu, Y., Manne, S., Gasmi, B., Liu, C., Zhong, H., Li, Y., Huang, A.C., Hirschhorn-Cymerman, D., Panageas, K.S., Wherry, E.J., Merghoub, T., Wolchok, J.D., 2018. Non-conventional Inhibitory CD4+Foxp3–PD-1hi T Cells as a Biomarker of Immune Checkpoint Blockade Activity. *Cancer Cell* 33, 1017-1032.e7. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2018.05.009>
149. Zea, A.H., Rodriguez, P.C., Atkins, M.B., Hernandez, C., Signoretti, S., Zabaleta, J., McDermott, D., Quiceno, D., Youmans, A., O'Neill, A., Mier, J., Ochoa, A.C., 2005. Arginase-Producing Myeloid Suppressor Cells in Renal Cell Carcinoma Patients: A Mechanism of Tumor Evasion. *Cancer Res.* 65, 3044–3048. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-4505>
150. Zhao, Y.-Z., Lin, Q., Wong, H.L., Shen, X.-T., Yang, W., Xu, H.-L., Mao, K.-L., Tian, F.-R., Yang, J.-J., Xu, J., Xiao, J., Lu, C.-T., 2016. Glioma-targeted therapy using Cilengitide nanoparticles combined with UTMD enhanced delivery. *J. Controlled Release* 224, 112–125. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.01.015>
151. Zhou, F., 2010. Expression of Multiple Granzymes by Cytotoxic T Lymphocyte Implies that They Activate Diverse Apoptotic Pathways in Target Cells. *Int. Rev. Immunol.* 29, 38–55. <https://doi.org/10.3109/08830180903247889>
152. Zhou, W., Ke, S.Q., Huang, Z., Flavahan, W., Fang, X., Paul, J., Wu, L., Sloan, A.E., McLendon, R.E., Li, X., Rich, J.N., Bao, S., 2015. Periostin secreted by glioblastoma stem cells recruits M2 tumour-associated macrophages and promotes malignant growth. *Nat. Cell Biol.* 17, 170–182. <https://doi.org/10.1038/ncb3090>

11. PUBLIKACJE Z UDZIAŁEM DOKTORANTKI

1. **Pilanc P**, Wojnicki K, Roura AJ, Cyranowski S, Ellert-Miklaszewska A, Ochocka N, Gielniewski B, Grzybowski MM, Błaszczyk R, Stańczak PS, Dobrzański P, Kaminska B. *A Novel Oral Arginase 1/2 Inhibitor Enhances the Antitumor Effect of PD-1 Inhibition in Murine Experimental Gliomas by Altering the Immunosuppressive Environment*. Front Oncol. 2021 Aug 24;11: 703465. doi: 10.3389/fonc.2021.703465. eCollection 2021.
2. Swatler J, Turos-Korgul L, Brewinska-Olchowik M, De Biasi S, Dudka W, Le BV, Kominek A, Cyranowski S, **Pilanc P**, Mohammadi E, Cysewski D, Kozłowska E, Grabowska-Pyrzewicz W, Wojda U, Basak G, Mieczkowski J, Skorski T, Cossarizza A, Piwocka K. *4-1BBL-containing leukemic extracellular vesicles promote immunosuppressive effector regulatory T cells*, Blood Adv. 2022 Mar 22;6(6):1879-1894. doi:10.1182/bloodadvances.2021006195.
3. Maleszewska M, Steranka A, Smiech M, Kaza B, **Pilanc P**, Dabrowski M, Kaminska B. *Sequential changes in histone modifications shape transcriptional responses underlying microglia polarization by glioma*. Glia. 2021 Jan;69(1):109-123. doi: 10.1002/glia.23887. Epub 2020 Jul 25.
4. Roura AJ, Gielniewski B, **Pilanc P**, Szadkowska P, Maleszewska M, Krol SK, Czepko R, Kaspera W, Wojtas B, Kaminska B. *Identification of the immune gene expression signature associated with recurrence of high-grade gliomas*. J Mol Med (Berl). 2021 Feb;99(2):241-255. doi: 10.1007/s00109-020-02005-7. Epub 2020 Nov
5. Rajan WD, Wojtas B, Gielniewski B, Miró-Mur F, Pedragosa J, Zawadzka M, **Pilanc P**, Planas AM, Kaminska B, *Defining molecular identity and fates of CNS-border associated macrophages after ischemic stroke in rodents and humans*. Neurobiol Dis. 2020 Apr; 137:104722. doi: 10.1016/j.nbd.2019.104722. Epub 2020 Jan 8.
6. Pytlarz M, Wojnicki K, **Pilanc P**, Kaminska B, Crimi A.J *Deep Learning Glioma Grading with the Tumor Microenvironment Analysis Protocol for Comprehensive Learning, Discovering, and Quantifying Microenvironmental Features*, J Imaging Inform Med. 2024 Aug;37(4):1711-1727. doi: 10.1007/s10278-024-01008-x. Epub 2024 Feb 27.

7. Kaminska P, Cyranowski S, **Pilanc P**, Malik AR. *Syngeneic Mouse Model of Glioblastoma: Intracranial Implantation of GL261 Cells* Methods Mol Biol. 2024; 2746:135-146. doi: 10.1007/978-1-0716-3585-8_11