



Warszawa, 20/05/2022

dr hab. n med. Małgorzata Firczuk
Zakład Immunologii
Warszawski Uniwersytet Medyczny
Ul. Nielubowicza 5, budynek F
tel. (4822) 5992172, email: mfirczuk@wum.edu.pl

RECENZJA rozprawy doktorskiej mgr Anny Felberg-Miętka
pt. „Znaczenie układu dopełniacza w powstawaniu nowotworów oraz w
terapii przeciwowotworowej”

Przestawiona do recenzji rozprawa doktorska wykonana została pod kierunkiem dr hab. Marcina Okroja, prof. GU Med. Projekt doktorski realizowany był w ramach grantu Sonata bis, finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki. Przedstawiona rozprawa doktorska ma formę zbioru czterech artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych: Journal of Immunological Methods, Frontiers in Immunology, British Journal of Haematology, Cancer Immunology, Immunotherapy oraz jednego manuskryptu złożonego do czasopisma. W trzech pracach Doktorantka jest pierwszym autorem, w dwóch drugim autorem. Dorobek naukowy Doktorantki oceniam wysoko.

Praca doktorska dotyczy zagadnień związanych z rolą układu dopełniacza w progresji nowotworów oraz w terapii za pomocą przeciwciał monoklonalnych. W pracy Doktorantka przedstawia również walidację nowego testu służącego do oceny aktywności układu dopełniacza oraz prezentuje możliwość zastosowania zmutowanych wariantów białek układu dopełniacza w terapii chorób nowotworowych za pomocą przeciwciał monoklonalnych. Tematyka podjęta przez Doktorantkę jest ciekawa i uzyskane wyniki mogą przyczynić się do lepszego poznania roli układu dopełniacza w patogenezie chorób nowotworowych i w mechanizmach działania przeciwciał monoklonalnych. W przyszłości, wyniki te mogą znaleźć zastosowanie w monitorowaniu terapii za pomocą przeciwciał monoklonalnych oraz mogą przyczynić się do poprawy skuteczności leczenia za pomocą przeciwciał monoklonalnych.



Oprócz publikacji napisanych w języku angielskim, rozprawa zawiera również dwa rozdziały napisane w języku polskim: Wstęp, w którym przedstawiono również cele pracy, oraz Dyskusję i Podsumowanie. Poniżej przedstawię komentarze i uwagi do poszczególnych części pracy.

Wstęp

Rozdział ten wprowadza czytelnika w tematykę prowadzonych badań, zawiera cele oraz streszczenie uzyskanych wyników.

Komentarze i pytania:

1. Chociaż rozdział ten zawiera wiele cennych informacji dotyczących tematu pracy, jest on opisany w sposób trochę chaotyczny: uzyskane wyniki przeplatają się z informacjami literaturowymi. W mojej ocenie podawanie szczegółowych informacji technicznych dotyczących wykonania testu CDC z wykorzystaniem komórek nowotworowych znakowanych kalceiną we Wstępie jest zbędne, gdyż są one opisane w Manuskrypcie 1 i 2 a istota testu jest wyjaśniona na Rycinie 2 przedstawionej na str. 13. Pomocny byłby podział na podrozdziały.
2. W tym rozdziale zabrakło mi klarownego opisu mechanizmów działania poszczególnych rodzajów przeciwciał anti-CD20 używanych w klinice. W opisie mechanizmów działania rytuksymabu na stronie 13 brakuje referencji. O przeciwciele typu II -obinutuzumabie -we wstępie Doktorantka w ogóle nie wspomina.

Publikacje nr 1 i 2

W artykułach tych Doktorantka opisała, zvalidowała i zastosowała test do oceny cytotoksycznej aktywności układu dopełniacza u chorych leczonych za pomocą terapeutycznych przeciwciał monoklonalnych. Za pomocą opracowanego testu uzyskała wiarygodne pomiary aktywności układu dopełniacza w surowicy chorych na rozrosty hematologiczne, leczonych za pomocą różnych przeciwciał monoklonalnych.

Komentarze i pytania:

1. Doktorantka wnioskuje na str. 85 oraz w publikacjach nr 1 i 2, że monitorowanie aktywności układu dopełniacza i stężenia rytuksymabu podczas terapii jest ważne w kontekście leczenia chorych na białaczki i chłoniaki i może wspomagać decyzje



Zakład Immunologii
Department of Immunology

terapeutyczne. W kohorcie pacjentów leczonych alemtuzumabem i ofatumumabem, analizowanej w Artykule nr 1, nie zaobserwowano jednak znaczących spadków aktywności cytotoksycznej układu dopełniacza. W kolejnej pracy (Artykuł nr 2), niska aktywność układu dopełniacza nie zawsze oznaczała brak odpowiedzi na leczenie (np. chorzy nr. 21 oraz 31). Ze względu na złożoność mechanizmów działania przeciwciał monoklonalnych, nie jest dla mnie jasne, w jaki sposób pomiar aktywności układu dopełniacza i stężenia przeciwciała mogą wspomóc decyzje terapeutyczne.

2. Użyte w pracy linie komórkowe i komórki pierwotne CLL nie zostały scharakteryzowane pod względem ilości CD20 oraz błonowych inhibitorów układu dopełniacza. Informacje te byłyby bardzo przydatne i mogłyby ułatwić interpretację wyników.

Publikacja nr 3

Publikacja nr 3 to list do redakcji czasopisma British Journal of Haematology, który jest komentarzem do pracy oryginalnej, w której wykazano, że zmiany w sekwencji aminokwasów paratopów w przeciwciałach monoklonalnych mogą zmieniać funkcje efektorowe przeciwciał. Do tej pracy nie mam uwag.

Publikacja nr 4

W pracy tej Doktorantka wykazała, że zmutowane warianty czynnika B o zwiększonej aktywności mogą nasilać efekt cytotoksyczny przeciwciał anti-CD20 względem komórek nowotworowych CD20-dodatnich i w ten sposób wspomagać skuteczność immunoterapii nowotworów. Efekt ten wynika z aktywności zmutowanych wariantów nawet w obecności inhibitorów układu dopełniacza.

Komentarze i pytania:

1. Na Ryc. 4 i 5 pokazano, że zmutowane warianty czynnika B nasilają cytotoksyczność układu dopełniacza tylko w niektórych liniach i w niskich stężeniach surowicy. Z informacji przytoczonych przez Doktorantkę w rozdziale „Wstęp” na str. 13 wynika, że testowane warianty czynnika B są odporne jedynie na niektóre inhibitory układu dopełniacza. Czy informacje o ilości błonowych inhibitorów dopełniacza (CD46, CD55, CD59) mogłyby ułatwić interpretację wyników przedstawionych na Ryc.4 i 5? Czy takie badania zostały wykonane?



Zakład Immunologii
Department of Immunology

2. W związku z tym, że ścieżka alternatywna układu dopełniacza aktywowana jest w sposób spontaniczny, czy strategia aktywacji tej ścieżki zaprezentowana przez Doktorantkę nie będzie ryzykowna? Czy nie będą niszczone inne komórki i tkanki prawidłowe? Wyniki przedstawione na Ryc. 7 pokazują wprawdzie, że ludzkie erytrocyty nie są lizowane w obecności wariantu czynnika B o zwiększonej aktywności, jednak nasuwa się kilka dodatkowych pytań: ilu donorów erytrocytów zostało przebadanych? Czy inne rodzaje komórek też nie są lizowane? Czy test był wykonany w kilku punktach czasowych?
3. Czy zdaniem Doktorantki zastosowanie zmutowanych wariantów czynnika B o zwiększonej aktywności może nasilić działania niepożądane, które są związane z aktywacją układu dopełniacza po wlewie rytuksymabu, tak jak opisano w pracy van dr Kolk, 2001, Br J Haematol (PMID: 11843813)?

Manuskrypt nr 5

W pracy tej Doktorantka wykazała, że podwyższona ekspresja jednego z rozpuszczalnych inhibitorów układu dopełniacza, czynnika I, koreluje z krótszym czasem przeżycia chorych na raka płuca. W pracy przedstawiono wyniki barwienia immunohistochemicznego skrawków tkanki nowotworowej dla czynnika I oraz czynnika C4d, który jest markerem aktywacji układu dopełniacza. W pracy nie wykazano korelacji pomiędzy ekspresją czynnika I a obecnością czynnika C4d w biopsjach tkanki nowotworowej, sugerując inne, niekanoniczne funkcje czynnika I w progresji raka płuca. W celu lepszego zrozumienia roli czynnika I w patogenezie raka płuc, wykonano knockout genu kodującego czynnik I w linii komórkowej H2087.

Komentarze i pytania:

1. Wyniki dotyczące wpływu ekspresji czynnika I na czas przeżycia chorych na raka płuca są wykonane z należytą starannością, na odpowiednio dużej kohorcie pacjentów. Doktorantka wykonała odpowiednie kontrole barwienia immunohistochemicznego na komórkach pozytywnych i negatywnych.
2. W załączonym Manuskrypcie 5 brakuje numeracji stron.
3. Trudno mi się zgodzić ze stwierdzeniem: „The absence of association between FI and C4d suggests that the role of this complement inhibitor in tumor cells is beyond the scope of regulating immune evasion”. Wniosek ten nie jest poparty wynikami,



Zakład Immunologii
Department of Immunology

przebadano bowiem tylko jeden marker, C3d, w bioptatach tkanki nowotworowej. Regulacja „immune evasion” to o wiele szersze zagadnienie.

4. Różnice w ekspresji genów po usunięciu czynnika I zbadano zaledwie na jednej linii komórkowej, trudno więc ocenić, na ile uzyskane wyniki są reprezentatywne. Wyniki globalnych różnic w ekspresji genów w komórkach pozbawionych ekspresji czynnika I zostały przedstawione w sposób mało czytelny, w Tabeli 2 brakuje parametrów statystycznych. W tekście znajdują się odnośniki do tabel/plików, które nie zostały przedstawione w pracy (np. Tabela 6, 7, 8, supplementary file_1).
5. W jaki sposób można wytłumaczyć, że pomimo, iż knockout czynnika I zwiększa migrację komórek, a więc nasila ich inwazyjność, to niska ekspresja tego czynnika u chorych koreluje z lepszym przeżyciem?

Podsumowanie

Podsumowanie i dyskusja to rozdział bardzo krótki, obejmujący 3,5 strony. W rozdziale tym Doktorantka podsumowała zwięźle uzyskane wyniki i przedstawiła wnioski.

Komentarze i pytania:

1. W Podsumowaniu na str. 85 Doktorantka odnosi się do niewłaściwych pozycji literaturowych, np. pozycje nr. 38, 39, 40.
2. W Podsumowaniu Doktorantka opisuje, że zastosowanie wariantów czynnika B tworzących konwertazę szlaku alternatywnego dopełniacza o zwiększonej aktywności wzbudza kontrowersje i proponuje zastosowanie wariantów czynnika C2, jako lepszej alternatywy dla aktywacji ścieżki klasycznej układu dopełniacza, odnosząc się do publikacji, która nie jest włączona do cyklu prac. Jednak wniosek ten nie jest spójny z wnioskami przedstawionymi we Wstępie do pracy na str. 17, gdzie Doktorantka opisuje potencjalne zastosowania wariantów czynnika B. Czy zatem planowane są dalsze badania mające na celu zastosowanie zmutowanych wariantów czynnika B u ludzi?



Wniosek końcowy

Na koniec chciałabym podkreślić, że pomimo moich uwag i pytań, jakie zadałam w recenzji, uważam, że wyniki uzyskane w niniejszej pracy doktorskiej są ciekawe i poszerzają wiedzę na temat roli układu dopełniacza w patogenezie chorób nowotworowych oraz w terapii za pomocą przeciwciał monoklonalnych. Rozprawa doktorska spełnia warunki stawiane rozprawom doktorskim określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478, 619, 1630). Wnioskuje zatem do Rady Naukowej Uniwersytetu Gdańskiego o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie mgr Anny Felberg-Miętki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Małgorzata Firczuk

.....
dr hab. n med. Małgorzata Firczuk