

Warszawa, 16 grudnia 2025

Dr hab. n med. Anna Szumera-Ciećkiewicz, prof. Instytutu

Biobank, Narodowy Instytut Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie

- Państwowy Instytut Badawczy

Ul. W.K. Roentgena 5, 02-781 Warszawa

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

I. Dane formalne

- Doktorantka: **lekarz Nina Miązek-Zapała**
- Tytuł rozprawy: **"Regulacja ekspresji antygeny CD20 przez szlak sygnałowy kinazy 3-fosfatydyloinozytolu i kinazy AKT w komórkach nowotworowych wywodzących się z limfocytów B"**
- Jednostka/uczelnia: **Zakład Immunologii Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego**
- Promotor: **dr hab. n. med. Magdalena Winarska**
- Promotor pomocniczy: **dr n. med. Małgorzata Bobrowicz**
- Dyscyplina: **Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu, w dyscyplinie nauki medyczne**
- Podstawa recenzji:

Recenzję sporządzono na podstawie przekazanej do oceny rozprawy doktorskiej pt. "Regulacja ekspresji antygeny CD20 przez szlak sygnałowy kinazy 3-fosfatydyloinozytolu i kinazy AKT w komórkach nowotworowych wywodzących się z limfocytów B", w formie monografii, zawierającej 139 stron wraz z opinią Komisji Bioetycznej przy Warszawskim Uniwersytecie Medycznym, nr KB/196/2014.

II. Ocena merytoryczna

- *Uzasadnienie podjęcia tematu i jego aktualność*

Terapie z wykorzystaniem przeciwciał monoklonalnych anti-CD20 stanowią filar leczenia wielu nowotworów limfoproliferacyjnych, w tym najczęstszego agresywnego chłoniaka w populacji Polski, którym jest chłoniak rozlany z komórek B [Diffuse Large B-cell Lymphoma; DLBCL]. Skuteczność kliniczna leczenia pozostaje zmienna, a oporność pierwotna i wtórna nadal stanowi istotny problem terapeutyczny. Kluczowym czynnikiem warunkującym efektywność przeciwciał jest dostępność i ilość antygeny docelowego na powierzchni komórki nowotworowej, a zmniejszenie

ekspresji CD20 na poziomie transkrypcyjnym, potranslacyjnym lub w wyniku zmian epigenetycznych jest opisywanym mechanizmem oporności na leczenie anty-CD20. W konsekwencji, identyfikacja osi regulacyjnych kontrolujących ekspresję CD20 oraz możliwość ich farmakologicznej modulacji ma znaczenie zarówno poznawcze (zrozumienie biologii oporności), jak i potencjalnie translacyjne (racjonalne projektowanie terapii skojarzonych i przewidywanie interakcji lek–przeciwciało). Istotnym kontekstem jest również fakt, że działanie rytuksymabu może angażować różne mechanizmy efektorowe, w tym cytotoksyczność zależną od dopełniacza (CDC) oraz mechanizmy zależne od komórek efektorowych (ADCC/ADCP), których względny udział zależy od typu nowotworu, mikrośrodowiska i właściwości komórki docelowej. W przełamywaniu oporności na leczenie stosuje się i testuje terapie anty-CD20 tzw. nowej generacji [np. ofatumumab, obinutuzumab], inhibitory BCR [np. ibrutinib], inhibitory kinaz LYN, LCK, SYK, BTK czy PI3K [np. duwelizyb czy umbralizyb] oraz inhibitory AKT tj. salinomycyna i pochodne. **Poruszana w pracy problematyka charakteryzuje się wysoką aktualnością, jest to temat ważny naukowo i klinicznie oraz odpowiada na realną lukę w literaturze. Wielowymiarowe badanie determinant ekspresji CD20 w modelach eksperymentalnych stanowi logiczny i ważny krok w kierunku poprawy skuteczności terapii anty-CD20.**

- *Cele pracy, hipotezy i pytania badawcze*

Doktoranka definiuje 4 cele badawcze:

„1. Zbadanie wpływu inhibitorów przekaznictwa sygnału z receptora BCR (z uwzględnieniem kinaz SYK, BTK, PI3K i AKT) na ilość antygenu CD20 na powierzchni komórek nowotworowych wywodzących się z limfocytów B.

2. Zbadanie wpływu inhibitorów kinaz SYK, BTK, PI3K i AKT na przeciwnowotworowy efekt przeciwciał monoklonalnych anty-CD20.

3. Zwiększenie ilości antygenu CD20 i spotęgowanie skuteczności działania przeciwciał anty-CD20 poprzez wpływ na ścieżkę PI3K/AKT.

4. Poszukiwanie mechanizmu wpływu salinomycyny i innych związków jonoforowych na ilość antygenu CD20.”

Doktoranka testuje hipotezę, że aktywność szlaku PI3K/AKT stanowi istotny regulator ekspresji CD20/MS4A1, a modulacja tego szlaku (bezpośrednia lub pośrednia, poprzez hamowanie sygnału z receptora BCR) prowadzi do mierzalnych zmian ilości CD20 na powierzchni komórek i przekłada się na zmianę wrażliwości na przeciwciała anty-CD20 w modelu funkcjonalnym. W ujęciu mechanistycznym weryfikowany jest również udział czynnika transkrypcyjnego FOXO jako potencjalnego węzła łączącego aktywność AKT z regulacją transkrypcji MS4A1.

- *Materiał i metody*

Dobór metod badawczych należy ocenić jako w pełni adekwatny do celu pracy, gdyż tworzy spójny, logicznie powiązany (przyczynowo skutkowy) ciąg doświadczeń pozwalający prześledzić zależności od poziomu sygnalizacji wewnątrzkomórkowej, poprzez regulację ekspresji genu i białka, aż do konsekwencji funkcjonalnych. Na szczególne podkreślenie zasługuje wielopoziomowość podejścia oraz konsekwentne domykanie wnioskowania na każdym etapie.

Zastosowanie farmakologicznej inhibicji kinaz SYK/BTK, a także komponentów szlaku PI3K/AKT (w tym inhibitora PI3K oraz inhibitorów AKT), umożliwia bezpośrednią ocenę wpływu aktywności tych szlaków na ekspresję CD20/MS4A1. Równoległe wykorzystanie narzędzi genetycznych (wyciszanie SYK/BTK oraz ukierunkowane manipulacje w obrębie osi AKT/FOXO) stanowią istotne wzmocnienie wiarygodności wnioskowania; ogranicza to ryzyko nadinterpretacji wyników w kategoriach efektów nieswoistych oraz wspiera rozróżnienie efektów zależnych od funkcji danego elementu szlaku od potencjalnych artefaktów farmakologicznych.

Pomiar ekspresji powierzchniowej CD20 metodą cytometrii przepływowej należy uznać za metodę najbardziej słuszną w kontekście biologii problemu, ponieważ bezpośrednio odzwierciedla dostępność epitopu dla przeciwciał anty CD20. Uzupełnienie o qRT PCR dla MS4A1 jest rozwiązaniem metodologicznie trafnym, gdyż umożliwia rozstrzygnięcie, czy obserwowane zmiany mają komponent transkrypcyjny, czy też są ograniczone do regulacji potranslacyjnej. Dodatkowo zastosowanie Western blot (dla AKT/pAKT oraz CD20) jest spójne z postawionym celem tzn. pozwala na weryfikację skuteczności modulacji szlaku sygnałowego oraz na odniesienie zmian powierzchniowych do poziomu całkowitego białka.

Doktorantka stosuje test cytotoksyczności zależnej od dopełniacza (CDC) z wykorzystaniem rytuksymabu/ofatumumabu oraz ludzkiej surowicy AB, który należy uznać za właściwy model funkcjonalny pozwalający bezpośrednio odpowiedzieć na pytanie, czy modulacja ekspresji CD20 przekłada się na skuteczność przeciwciał anty CD20 w mechanizmie zależnym od dopełniacza. Jest to istotny element dla uzyskanych wyników, wykraczający poza opis korelacji ekspresyjnych.

Na uwagę zasługuje weryfikacja hipotezy dotyczącej udziału FOXO w regulacji CD20 poprzez zastosowanie CRISPR/Cas9 do wyciszenia FOXO1/FOXO3. Takie podejście pozwala na testowanie zależności mechanistycznej na poziomie przyczynowym, a nie jedynie asocjacyjnym, i stanowi istotny element dopełniający dla proponowanego modelu regulacyjnego pomiędzy AKT a ekspresją MS4A1/CD20.

W konsekwencji zestaw zastosowanych technik jest metodologicznie koherentny i odpowiada na pytanie badawcze zarówno na poziomie molekularnym (transkrypt/białko/sygnalizacja), jak i na poziomie efektu funkcjonalnego.

- *Analiza statystyczna i interpretacja wyników*

Dobór metod statystycznych oraz przyjęty poziom istotności należy ocenić jako właściwe i dostosowane do charakteru danych. Prezentacja wyników jest rzetelna, przejrzysta i konsekwentnie ustrukturyzowana, co ułatwia śledzenie toku rozumowania oraz weryfikację kolejnych etapów wnioskowania. W granicach przyjętego warsztatu badawczego oraz zastosowanego modelu *in vitro* zaprezentowany materiał wynikowy jest wystarczający do obrony hipotezy roboczej i realizacji założonych celów.

Kluczowy wniosek płynący z przedstawionych danych wskazuje, że ekspresja CD20 w komórkach nowotworów wywodzących się z limfocytów B podlega dynamicznej regulacji zależnej od sygnalizacji receptora BCR, a farmakologiczna modulacja tej sygnalizacji bezpośrednio determinuje skuteczność przeciwciał anty CD20 w mechanizmie CDC.

W pierwszym bloku doświadczeń wykazano, iż hamowanie kluczowych elementów szlaku BCR – kinaz SYK i BTK (odpowiednio R406 oraz ibrutinib) – prowadzi do istotnego obniżenia poziomu CD20 na powierzchni komórek w modelach chłoniakowych (m.in. Raji i Ly 1). Za ważny element kontroli należy uznać fakt, że efekt ten nie wynikał z nieswoistej toksyczności w zastosowanych warunkach, gdyż żywotność komórek pozostawała wysoka. Konsekwencją funkcjonalną obniżenia ekspresji CD20 było osłabienie CDC indukowanego przez rytuksymab lub ofatumumab. Istotne jest również, że nie odnotowano zmian, które w sposób przekonujący pozwalałyby przypisać obserwowany efekt modulacji ekspresji inhibitorów dopełniacza (CD46/CD55), co wzmacnia interpretację, iż czynnikiem limitującym CDC jest przede wszystkim redukcja dostępności antygenu docelowego.

Dane molekularne wspierają obecność komponentu transkrypcyjnego regulacji: po ekspozycji na inhibitory SYK/BTK oraz inhibitory osi PI3K/AKT (w tym idelalizyb i inhibitory AKT) stwierdzono spadek poziomu transkryptu MS4A1, kodującego CD20, czemu towarzyszył spadek wrażliwości komórek na CDC. Szczególnie przekonujące jest wykazanie, że wyciszenie SYK lub BTK metodą shRNA odtwarzało fenotyp obserwowany po zastosowaniu inhibitorów (spadek CD20 oraz osłabienie CDC), co przemawia za zależnością przyczynową i zgodnością efektów farmakologicznych z rolą biologiczną tych kinaz.

W kolejnych analizach Doktorantka udowodniła, że nadekspresja aktywnej AKT prowadzi do wzrostu CD20. Jednocześnie inaktywacja FOXO1 metodą CRISPR/Cas9 skutkowała wzrostem CD20, podczas gdy analogicznego efektu nie obserwowano dla FOXO3, co sugeruje różnicowanie funkcji poszczególnych członków rodziny FOXO w regulacji CD20/MS4A1.

Istotnym dopełnieniem jest obserwacja, że salinomycyna zwiększa ekspresję CD20 (zarówno na poziomie powierzchniowym, jak i całkowitym) oraz konsekwentnie uwrażliwia komórki na CDC indukowane przez przeciwciała anty CD20 w wielu liniach. Takie działanie wspiera wzrost aktywności

promotora MS4A1 oraz dane wskazujące na udział osi AKT–FOXO, przy jednoczesnym braku przesłanek, aby kluczową rolę w obserwowanym efekcie odgrywały NF- κ B lub prosta modulacja SMAD2/3.

Całość rezultatów prowadzi do wniosku o istotnym znaczeniu praktycznym wskazującym, iż projektowanie strategii łączących terapie celowane z immunoterapią anty-CD20 powinno uwzględniać wpływ zastosowanych leków na poziom CD20, a w konsekwencji na skuteczność mechanizmów efektorowych zależnych od dopełniacza. Sposób prezentacji wyników jest bardzo czytelny i sprzyja krytycznej analizie danych.

Ilustracje dokumentujące badane zależności i wyniki są zawarte w 36 rycinach i 7 tabelach. Stanowią one kompletne i właściwe dopełnienie do przeprowadzonych testów i analiz.

- *Dyskusja*

Dyskusja obejmuje 13 stron i zawiera odniesienie do aktualnej literatury [imponująca liczba piśmiennictwa – 287 pozycji]. Doktorantka przeprowadza krytyczną interpretację uzyskanych wyników, wskazując na ograniczenia i implikacje praktyczne.

- *Wnioski*

Doktorantka sformułowała 8 wniosków wynikających z uzyskanych wyników badań i danych statystycznych. Są one zwięzłe, jednoznaczne i wskazują na istotny oryginalny wkład w omawianą problematykę.

III. Strona edytorska i język

Praca jest czytelnie napisana w sposób przemyślany. Mimo, skomplikowanej i złożonej części eksperymentalno-badawczej dobrze się ją czyta i dzięki konsekwentnego układu rozdziałów można łatwo znaleźć właściwą treść.

Bardzo drobne błędy literowe [Spis treści: „działanie” zamiast „działanie” oraz „w mechanizmu” zamiast „w mechanizmie” (pozycja 1.4.3 na s. 5) czy w nagłówku i spisie treści: „chemioterapeutykami” powinno być „chemioterapeutykami” (nagłówek 1.3.5 na s. 28 oraz w spisie treści)] w żaden sposób nie umniejszają wartości pracy.

IV. Uwagi merytoryczne i pytania do Doktorantki

- Prośba o wyjaśnienie czy schematy z Ryciny 1 i Ryciny 2 były wykonane samodzielnie? Jeśli nie, zwykle powinno się podać źródło, na którym wzorowano Ryciny.
- Czy Doktorantka planowała walidację *ex vivo* (choć części badań) na materiale od pacjentów?
- Czy uzyskane dane sugerują, że jednoczesne podawanie inhibitora BTK/PI3K/AKT z anty-CD20 może osłabiać skuteczność terapii u pacjentów?

- Jakie potencjalne biomarkery można by wdrożyć w przyszłości do praktyki klinicznej, aby przewidywać spadek ekspresji CD20 u pacjentów otrzymujących terapię z udziałem inhibitorów (np. SYK/BTK lub elementów szlaku PI3K/AKT)?

V. Podsumowanie i konkluzja

Rozprawa doktorska pt. „Regulacja ekspresji antygenu CD20 przez szlak sygnałowy kinazy 3-fosfatydylinozytolu i kinazy AKT w komórkach nowotworowych wywodzących się z limfocytów B” stanowi samodzielne, rzetelnie przygotowane i merytorycznie wartościowe opracowanie, które wnosi istotny wkład w rozwój wiedzy oraz pogłębia rozumienie analizowanego zagadnienia. Praca została opracowana w sposób przemyślany i konsekwentny, a przedstawione rozważania charakteryzują się poprawnością metodologiczną oraz przejrzystą strukturą wyводу. Postawione cele badawcze zostały w pełni zrealizowane, a dobór zastosowanych metod należy uznać za kompleksowy i trafny do problematyki oraz zakresu przeprowadzonych badań. Uzyskane wyniki są przekonująco omówione, a wnioski zostały sformułowane w sposób jasny i dobrze uzasadniony.

Na podstawie przedstawionej rozprawy stwierdzam, iż spełnia ona wszystkie wymagania stawiane rozprawom doktorskim zgodnie z obowiązującymi przepisami. W związku z powyższym wnioskuję do Rady Dyscypliny Nauk Medycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie Doktorantki lekarz Niny Miązek-Zapały do dalszych etapów postępowania i publicznej obrony pracy doktorskiej.

Jednocześnie gratuluję Doktorantce przygotowania wartościowej pracy i życzę dalszych sukcesów w działalności naukowej. Z uwagi na wysoki poziom merytoryczny rozprawy oraz jej znaczenie dla rozwoju dyscypliny wnioskuję również o wyróżnienie niniejszej rozprawy doktorskiej.