



Prof. dr hab. Marcin Okrój
Zakład Biologii Komórki i Immunologii
Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii UG-GUMed
Ul. Dębinki 1, 80-211 Gdańsk
e-mail: marcin.okroj@gumed.edu.pl

Gdańsk 7 stycznia 2026 r.

Recenzja pracy doktorskiej lek. Niny Miązek-Zapały pt.
„Regulacja ekspresji antygenu CD20 przez szlak sygnałowy kinazy 3-fosfatydyloinozytolu i kinazy AKT w komórkach nowotworowych wywodzących się z limfocytów B”

Przedstawiona mi do oceny praca doktorska lek. Niny Miązek-Zapały zatytułowana „Regulacja ekspresji antygenu CD20 przez szlak sygnałowy kinazy 3-fosfatydyloinozytolu i kinazy AKT w komórkach nowotworowych wywodzących się z limfocytów B” ma formę monografii. Autorka opisuje stan dostępnej wiedzy na temat immunoterapii złośliwych limfoproliferacji wywodzących się z limfocytów B i mechanizmów efektorowych jednego z najpopularniejszych immunoterapeutyków stosowanych w leczeniu ww., rytuksymabu. Następnie w pracy znajdujemy wprowadzenie w zagadnienia sygnalizacji wewnątrzkomórkowej istotnej w kontekście fizjologii limfocytów B, białaczek B-limfocytarnych oraz chłoniaków a także opis związków jonoforowych takich jak salinomycyna, które oprócz udowodnionego działania przeciwdrobnoustrojowego stanowią interesującą grupę kandydatów na leki przeciwnowotworowe. Następnie Doktorantka przechodzi do opisu celów pracy, które definiuje w kolejności jako: i) określenie wpływu inhibitorów sygnalizacji przez receptor BCR na ilość antygenu CD20 na powierzchni komórek nowotworowych wywodzących się z limfocytów B, ii) określenie wpływu inhibitorów kinaz SYK, BTK, PI3K i AKT na przeciwnowotworowy efekt przeciwciał monoklonalnych anti-CD20, iii) opisanie modulacji ścieżki PI3K/AKT mającej na celu zwiększenie ilości antygenu CD20 i aktywności cytotoksycznej przeciwciał anti-CD20 wobec komórek docelowych, oraz iv) identyfikację mechanizmu oddziaływania związków jonoforowych na ilość antygenu CD20. W kolejnych rozdziałach pracy Autorka przedstawia opis zastosowanych materiałów i metod badawczych, obejmujących szerokie spektrum technik biologii komórki i biologii molekularnej. Wykorzystano m.in. hodowle komórkowe *in vitro* ludzkich linii nowotworowych wywodzących się z limfocytów B, metody cytometrii przepływowej do ilościowej analizy antygenów powierzchniowych i sortowania komórek, testy cytotoksyczności zależnej od układu dopełniacza, a także techniki biochemiczne i molekularne, w tym western blotting, ilościową analizę ekspresji genów metodą qRT-PCR oraz testy aktywności promotora genu MS4A1 a także metody modulacji ekspresji genów, takie jak transdukcja lentiwirusowa oraz wyciszanie genów z użyciem systemu CRISPR/Cas9. Rozdział poświęcony wynikom badań własnych został uporządkowany w sposób odpowiadający sformułowanym celom pracy i obejmuje analizę wpływu modulacji kluczowych elementów sygnalizacji receptora BCR oraz szlaku PI3K/AKT na ekspresję antygenu CD20 i skuteczność działania przeciwciał monoklonalnych anti-CD20. Autorka wykazuje znaczenie kinaz SYK, BTK, PI3K i AKT oraz białek z rodziny FOXO w regulacji ekspresji CD20. W tym samym kontekście przedstawia także wyniki dotyczące działania salinomycyny i jej pochodnych. Dane te wskazują na możliwość farmakologicznej modulacji ilości CD20 na powierzchni komórek nowotworowych i przez to zwiększenia efektywności immunoterapii opartej na przeciwciałach anti-CD20.

Ocena formalna pracy

Rozprawa doktorska zawiera się w postaci wydruku w formacie A4, na który składa się 4 strony spisu rycin i tabel, 7 stron wykazu używanych skrótów, streszczenia w języku polskim i angielskim obejmujące po jednej stronie, 23 strony wstępu, jedna strona wymieniająca cele pracy, 20 stron opisu wykorzystywanych

materialów i metod, 32 strony opisu wyników, 14 stron dyskusji, jedna strona podsumowująca wnioski z pracy oraz wykaz piśmiennictwa zawierający się na 24 stronach, obejmujący 287 pozycji literaturowych. Do pracy dołączono także skan pozytywnej opinii właściwej komisji bioetycznej na temat prowadzonego projektu badawczego. W skład pracy doktorskiej wchodzi 7 tabel i 36 rycin.

Układ pracy jest typowy dla podobnych monografii a wprowadzony podział na rozdziały i podrozdziały jest przejrzysty i dobrze wprowadza czytelnika w zagadnienie oraz dobrze odzwierciedla logikę i chronologię badań. Praca jest napisana starannie, występują w niej co prawda pojedyncze błędy tzw. literówki a kilka razy zamiast fachowego słownictwa zostały użyte kolokwializmy, niemniej przy tej objętości tekstu jest to zjawisko marginalne, które nie wpływa na całościowy, pozytywny obraz pracy.

Merytoryczna ocena pracy

Tematyka podjęta przez doktorantkę wpisuje się w jeden z głównych nurtów badawczych zespołów prof. Magdaleny Winiarskiej, a wcześniej zespołu prof. Jakuba Gołąba, mianowicie modulacji szlaków sygnałowych prowadzących do zmiany ekspresji antygenów powierzchniowych komórek nowotworowych i ich uwrażliwienia na immunoterapeutyki. Modelem badawczym użytym w ramach prac nad rozprawą doktorską były ludzkie linie komórek transformowanych nowotworowo, ekspresujące antygen powierzchniowy CD20, przy czym najczęściej stosowano komórki linii Raji. Jako modelowe immunoterapeutyki zastosowano przeciwciała anti-CD20 należące do tzw. typu I, czyli cechujące się wysoką aktywnością CDC oraz względnie niskim potencjałem do wywoływania efektów bezpośrednich. Najczęściej stosowano najpopularniejsze i historycznie pierwsze z ww. przeciwciał, rytuksymab, w niektórych doświadczeniach używano także przeciwciała anti-CD20 drugiej generacji, ofatumumabu. Doktorantka omówiła szczegółowo we wstępie ważną rolę, jaką mimo upływu niemal 30 lat od pierwszej rejestracji pełni rytuksymab jako podstawa licznych schematów terapeutycznych oraz fakt, iż mimo prac nad nowymi generacjami przeciwciał anti-CD20 nie są one w stanie w niektórych wskazaniach przynieść większa korzyść dla pacjenta niż ich prototypowe przeciwciało. Czytelnik rozprawy doktorskiej otrzymuje zatem jasny przekaz, iż strategię polegającą na modulacji komórek nowotworowych mające na celu większe uwrażliwienie ludzkich komórek białaczek i chłoniaków B-limfocytarnych na dotychczas stosowane immunoterapeutyki to niezwykle istotny nurt badań biomedycznych nie tylko z naukowego ale także z praktycznego punktu widzenia.

W części wynikowej pracy Doktorantka zamieściła opis spójnego cyklu doświadczeń, w którym przeprowadziła kompleksową analizę mechanizmów regulujących ekspresję antygenu CD20 w komórkach nowotworowych wywodzących się z limfocytów B oraz ich znaczenia dla skuteczności terapii przeciwciałami anti-CD20. Wykazała m.in., iż farmakologiczna inhibicja kinaz SYK i BTK, jak również ich wyciszenie na poziomie ekspresji genów, prowadzi do istotnego zmniejszenia ilości CD20 na powierzchni komórek oraz wpływa na efektywność cytotoksycznego działania przeciwciał monoklonalnych, przy czym efekt ten nie był związany ze zmianą ilości błonowych inhibitorów układu dopełniacza. W kolejnym doświadczeniu Autorka wykazała przy pomocy techniki qRT-PCR, iż obserwowana zmiana jest zauważalna na poziomie transkrypcji genu MS4A1 a także zademonstrowała, iż efekt obniżenia ekspresji CD20 uzyskany przez farmakologiczne hamowanie kinaz SYK i BTK można także uzyskać poprzez wyciszenie ekspresji ww. kinaz przez transdukcję komórek wektorami lentiwirusowymi zawierającymi shRNA wyciszające kodujące je geny. Następnie sprawdzono, czy farmakologiczne hamowanie innych składowych szlaku sygnalizacyjnego od receptora BCR takich jak kinazy PI3K oraz AKT również odtworzy efekt uzyskany przy hamowaniu kinaz SYK i BTK. Co istotne, w tym oraz innych doświadczeniach Doktorantka dołożyła starań, aby do testów wybrać stężenia inhibitorów niepowodujące bezpośredniego działania toksycznego wobec komórek. Wobec potwierdzenia hipotezy przetestowano układ odwrotny, tzn. taki, w którym zwiększenie aktywności kinazy AKT miało skutkować wzrostem ekspresji CD20 i przez to uwrażliwieniem komórek na cytotoksyczne działanie rytuksymabu. W tym celu posłużono transdukcją retrowirusową, która dostarczała do komórek sekwencję kodującą konstytutywnie aktywną kinazę AKT oraz marker fluorescencyjny GFP. Doświadczenie ostatecznie potwierdziło, iż przez zwiększenie aktywności AKT możliwe jest zwiększenie ilości antygenu CD20 na powierzchni. W kolejnych doświadczeniach wykazano kluczową rolę białka efektorowego kinazy AKT, FOXO1 w obserwowanym efekcie zwiększenia ekspresji CD20. Otrzymane wyniki dały podwaliny pod

kolejną część pracy mającą na celu przetestowanie możliwości zwiększenia ekspresji CD20 na komórkach nowotworowych przez działanie farmakologiczne na kinazę AKT. W ramach tego zadania Doktorantka z powodzeniem testowała związki o charakterze jonoforów, w tym wspomnianą wcześniej salinomycynę, która w stężeniu nietoksycznym dla komórek powodowała nawet czterokrotny wzrost ekspresji CD20 na błonie komórkowej i idące za tym zwiększenie wydajności przeciwciał anti-CD20 w reakcji cytotoksyczności zależnej od dopełniacza.

Reasumując, część doświadczalna pracy doktorskiej cechuje się różnorodnością technik biologii molekularnej i biotechnologii, które zostały zaprzęgnięte do wykonania spójnego narracyjnie projektu badawczego o istotnym znaczeniu zarówno naukowym jak i klinicznym. Tym samym, Doktorantka wykazała się umiejętnością zastosowania ww. technik w praktyce a także dojrzałą interpretacją otrzymanych wyników, czemu dała wyraz w dyskusji obejmującej zarówno konfrontację jej wyników z istniejącą literaturą przedmiotu a także omówienie limitów i ograniczeń pracy, które nie pozwalają jeszcze na tym etapie na zaplanowanie badań klinicznych z udziałem salinomycyny i jej pochodnych, aczkolwiek sama praca stwarza przesłanki do kontynuacji badań podstawowych, np. w modelach *in vivo* czy inicjacji innych badań przedklinicznych.

Uwagi i komentarze (wraz z prośbą o odniesienie się w czasie publicznej obrony pracy doktorskiej):

- 1) Strona 25 (wstęp), zdanie: „Antygeny (CD20 – przyp.) nie wytwarzają wczesne komórki prekursorowe ani plazmatyczne, dlatego nie ma ryzyka trwałego zniszczenia populacji limfocytów B ani całkowitego upośledzenia odpowiedzi humoralnej podczas terapii rytuksymabem” – istnieją doniesienia naukowe podnoszące problem niekompletnego odzyskiwania puli różnorodnych klonów limfocytów B wobec stanu przed terapią, w szczególności niektórych komórek pamięci immunologicznej, przez pacjentów leczonych rytuksymabem.
- 2) Strona 26 (wstęp) – Proszę o doprecyzowanie, co Doktorantka miała na myśli pisząc o działaniu dopełniacza po związaniu rytuksymabu do antygeny CD20, używając pojęcia „czynniki bakteriobójcze”. Konkretnie chodzi o zdanie „Jest to kanał perforujący błonę komórek B, przez który z komórki na zewnątrz wydostają się jony, substancje odżywcze i ATP, a do środka napływa woda i czynniki bakteriobójcze”
- 3) Strona 27 (wstęp): Zdanie w rozdziale poświęconym cytotoksyczności zależnej od przeciwciał (ADCC) i fagocytozie zależnej od przeciwciał (ADCP) może błędnie sugerować, iż FcγRIII jest głównym receptorem fagocytarnym, podczas gdy jego wpływ na fagocytozę jest pośredni - może on jedynie modulować ww. proces. Sugeruję rozdzielić zdania odnoszące się do komórek efektorowych mechanizmu ADCC o ADCP. Kilka akapitów poniżej znajduje się opis tzw. efektu szczepionkowego rytuksymabu (tj. wydajniejszej odpowiedzi na lek po jego kolejnym podaniach), który jest dość wątpliwy i stoi w kontraście do opisywanego mechanizmu selekcji komórek opornych wskutek fagocytozy i/lub złuszczenia i internalizacji antygeny CD20 pod wpływem suboptymalnego stężenia leku w kompartmentach o niższej biodostępności.
- 4) Strona 29 (wstęp) – Na jakiej podstawie receptor CR1 (CD35) został uznany za mniej aktywny w porównaniu do CD46, CD55 i CD59?
- 5) Strona 49 (metody) – Czy jony Mg^{2+} i Ca^{2+} rzeczywiście mogą inaktywować trypsynę, jak zostało to ujęte w pracy, czy też idea używania buforu pozbawionego ww. podczas trypsynizacji komórek ma inne przyczyny?

- 6) Strony 54 i 55 (metody) – Czy przy analizie przeżywalności komórek metodą inkorporacji jodku propidyny, szczególnie w testach CDC, doktorantka dopuszcza możliwość, iż w relatywnie krótkim czasie może dochodzić do fizycznej dezintegracji komórek, wskutek czego otrzymujemy zaniżony wynik testu gdyż komórki takie umykają analizie i nie są odczytywane przez cytometr jako PI-pozytywne?
- 7) Strona 67 (metody) – Doktorantka opisuje, iż we wszystkich eksperymentach (chyba, że zaznaczono inaczej) wykonywano minimum po 2 powtórzenia biologiczne i 2 powtórzenia techniczne. Informacja ta wnosi niepewność, ponieważ czytelnik nie wie, w których doświadczeniach wykonano rzeczywiście tylko dwa niezależne powtórzenia a w których trzy (co jest szeroko przyjęte dla dziedziny biologii molekularnej i komórkowej) lub więcej. Należy jednak zauważyć, że we większości eksperymentów widoczne jest bardzo niskie odchylenie standardowe, co dodaje wiarygodności wynikom, poza nielicznymi wyjątkami jak np. na rycinie 28, przy ocenie ekspresji CD22.
- 8) Strona 75 (wyniki) – Zdanie dotyczące porównania działania inhibitorów kinaz BTK i SYK z efektem wyciszenia ekspresji ich genów mówi iż „Upośledzenie działania rytuksymabu było jednak mniejsze niż w przypadku zastosowania inhibitorów kinaz BTK lub SYK”, wobec czego nasuwa się pytanie o interpretację takiego wyniku pod kątem istnienia niespecyficznego działania inhibitorów BTK i SYK.
- 9) Strony 81 i 87 – Jak wyniki Western Blottingu z ryciny 17, na której widoczny jest brak działania salinomycyny na aktywność kinazy AKT w komórkach innych niż Raji, współgra z wynikiem przedstawionym dla tych linii na rycinie 23? Czy w liniach Pfeiffer i Karpas postuluje się inny mechanizm działania salinomycyny?
- 10) Bazowa przeżywalność komórek Raji na rycinie 22 różni się znacząco od tej przedstawionej na rycinach 4 i 11. Z opisu pod ryciną 22 można wyczytać, iż w doświadczeniu użyto 10% ludzkiej surowicy podczas gdy w ogólnym opisie metod i testów CDC teoretyczna procentowość surowicy powinna plasować się w okolicach 16,6%. Czy jest to jedyna różnica między doświadczeniami?

Wskazane powyżej uwagi i komentarze nie powinny umniejszać charakteru osiągnięcia naukowego lek. Niny Miązek-Zapały. Oceniam je jako istotny wkład w poznanie i rozumienie procesów modulacji ekspresji antygenów powierzchniowych komórek chłoniaków i białaczek B-limfocytarnych, który może realnie znaleźć swój ciąg dalszy w badaniach przedklinicznych i klinicznych. Na uwagę zasługuje też fakt, iż część wyników została wykorzystana w publikacjach naukowych Zespołu wydanych przed przygotowaniem rozprawy doktorskiej, co znacznie wpływa na ich upowszechnienie w obiegu naukowym. Niniejszym stwierdzam, iż **rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2018 poz. 1668) i wnoszę do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauk Medycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**
