



Prof. dr hab. Maciej Cedzyński  
Instytut Biologii Medycznej PAN,  
Pracownia Immunobiologii Zakażeń,  
ul. Lodowa 106  
93-232 Łódź  
e-mail: mcedzynski@cbm.pan.pl

### Ocena rozprawy doktorskiej Mgr Anny Felberg-Miętki

**pt. „Znaczenie układu dopełniacza w powstawaniu nowotworów oraz w terapii przeciwnowotworowej”.**

Mimo, że pierwsze artykuły naukowe dotyczące dopełniacza opublikowano jeszcze w XIX wieku, znaczenie tego złożonego układu w utrzymaniu lub przywróceniu homeostazy oraz jego udział w patogenezie chorób o różnym podłożu jest nadal przedmiotem intensywnych badań. Dopełniacz współdziała z innymi mechanizmami odporności humoralnej i komórkowej, zarówno wrodzonej jak i nabytej oraz innymi kaskadami aktywowanymi enzymatycznie (układ krzepnięcia/fibrinolizy, układ kalikreina-kinina). Uczestniczy między innymi w procesach zapłodnienia, rozwoju embrionalnego, odpowiedzi na zakażenie i nowotworzenie. Odpowiedź przeciwwzakaźna zazwyczaj przyczynia się do eliminacji patogenów na drodze bezpośredniej lizy lub poprzez nasilenie fagocytozy, kiedy jednak postępuje w sposób niekontrolowany, może być niekorzystna dla gospodarza, w skrajnych przypadkach przyczyniając się do rozwoju reakcji wstrząsowych i śmierci. Podobnie, w nowotworach, dopełniacz jest obecnie rozpatrywany raczej jako „miecz obosieczny” niż jednoznacznie korzystny mechanizm ochronny: z jednej strony uczestniczy w usuwaniu komórek ulegających apoptozie, nekrozie, transformacji nowotworowej czy onkogennych patogenów, a także wzmacnia działanie przeciwciał terapeutycznych, z drugiej – może sprzyjać powstawaniu i rozprzestrzenianiu się nowotworu przez udział w przewlekłych procesach zapalnych, promowaniu proliferacji, wzrostu guza, przejścia nabłonkowo-mezenchymalnego, angiogenezy i przerzutowania. Efekt działania dopełniacza zależy nie tylko od właściwości komórek rakowych ale też od mikrośrodowiska guza.

Przedstawiona do oceny rozprawa Pani mgr Anny Felberg-Miętki, zatytułowana „Znaczenie układu dopełniacza w powstawaniu nowotworów oraz w terapii przeciwnowotworowej” dotyczy właśnie tego, wspomnianego wyżej, niezwykle złożonego problemu. Rozprawa ta ma postać spójnego zbioru 4 publikacji i 1 manuskryptu podlegającego recenzji. Jedna z publikacji ma charakter „editorial comment”, pozostałe są artykułami oryginalnymi. Prace zostały opublikowane w czasopiśmie uwzględnionych w Journal Citation Reports, a ich współczynnik wpływu (impact factor) wynosi od 2,303 do 7,561 (sumarycznie: 23,83; 490 punktów MEiN, dane dla artykułów opublikowanych). Doktorantka jest samodzielną pierwszą Autorką artykułów 2 i 4 i równorzędną pierwszą Autorką pozostałych. Jej wiodący udział w powstaniu prac wchodzących w skład rozprawy został potwierdzony oświadczeniami Współautorów.



Rozprawa została uzupełniona o krótkie ale rzeczowe rozdziały „Wstęp” i „Podsumowanie i dyskusja” oraz wykaz cytowanej literatury, dwujęzyczne streszczenie i spis rycin niezamieszczonych w publikacjach.

Wstęp obejmuje ogólne wprowadzenie do tematyki pracy, określenie jej celów i omówienie uzyskanych wyników, zamieszczonych w publikacjach i manuskrypcie. Jako pierwszy cel badań, Pani mgr Anna Felberg-Miętka określiła **analizę markerów aktywacji układu dopełniacza powstających w czasie leczenia chorych na białaczki B-limfocytarne przy pomocy przeciwciał anty-CD20 oraz korelację otrzymanych wyników z danymi klinicznym**. Publikacje 2 i 3, odnoszące się do realizacji tego zadania obejmują wyniki badań inaczej (szerzej) zdefiniowanej grupy chorych - osób z rozpoznaniem nowotworów z komórek B. W związku z tym, proszę Doktorantkę o wyjaśnienie tej rozbieżności i krótkie omówienie podstawowych różnic pomiędzy białaczkami i chłoniakami wywodzącymi się z linii limfocytów B.

**W publikacji 1 (*J. Immunol. Methods*)** zwrócono uwagę na pewną niedoskonałość metody CH50 stosowanej do oceny cytotoksyczności zależnej od dopełniacza, związaną z brakiem ludzkich inhibitorów aktywacji tej kaskady, na powierzchni erytrocytów owczych. Autorzy artykułu zaproponowali alternatywną, nowatorską procedurę wykorzystującą linię ludzkich komórek nowotworowych, pobierających kalceinę z podłoża i zdolnych do przekształcenia jej we fluorescencyjny metabolit. W wyniku cytotoksycznej aktywności dopełniacza w surowicy ludzkiej, pochodna ta jest uwalniana do środowiska, a pomiar intensywności fluorescencji pozwala na oszacowanie odsetka komórek, które uległy lizie. Przydatność zaproponowanej metody została wykazana na podstawie badań aktywności dopełniacza w próbach surowicy kilkunastu chorych na przewlekłą białaczkę limfocytową, leczonych alemtuzumabem i alemtuzumabem skojarzonym z ofatumumabem. Próby te były pobierane przed kolejnymi wlewami przeciwciał terapeutycznych, a wyniki oznaczeń - porównywane z danymi uzyskanymi w teście hemolizy. W ciągu kilkunastu tygodni leczenia pozyskano po 7 prób i dodatkowo jedną, po 2 miesiącach katamnezy. Znaczącą statystycznie korelację wyników obu testów uzyskano tylko w przypadku 2 pacjentów (mimo niekiedy wysokich wartości współczynnika R Spearmana). Fakt ten nie oznacza jednak, że przyjęto błędne założenia i nie świadczy o nieprzydatności zaproponowanej procedury. Przeciwnie, **użycie ludzkich komórek nowotworowych z ekspresją CD20** przybliży warunki eksperymentalne do rzeczywistej sytuacji w organizmie chorego znacznie bardziej niż wykorzystanie erytrocytów obcych gatunkowo, jak wspominałem, pozbawionych ludzkich inhibitorów aktywacji dopełniacza, co powoduje ich wysoką wrażliwość na ludzką surowicę. Czy metoda ta znajdzie zastosowanie w diagnostyce? Z pewnością konieczne są dalsze, zakrojone na szerszą skalę badania. Na pewno jednak **stanowi cenne narzędzie**, które może być wykorzystane w pracy eksperymentalnej dotyczącej dopełniacza. Jej dodatkową zaletą jest uniknięcie korzystania z komponentów pochodzących z krwi zwierzęcej.

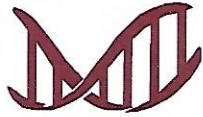
**W publikacji 2 (*Front. Immunol.*)** wykazano konsumpcję składników dopełniacza oraz znaczący wzrost stężenia produktów jego aktywacji: C4d i C5b-9 (TCC, MAC), w odpowiedzi na podanie pierwszej dawki rytuksymabu, u 28 chorych na przewlekłą białaczkę limfocytową lub chłoniaki niezziarnicze. Kolejne infuzje (w odstępach czterotygodniowych) powodowały akumulację leku lecz



nie wpływały w dużym stopniu na konsumpcję/stężenie produktów aktywacji dopełniacza. Także aktywność cytotoksyczna surowicy pacjentów (**CDC oznaczana metodą zaproponowaną w publikacji 1**) pozostawała na niezmiennym, wysokim poziomie. Na podstawie przedstawionych wyników, Doktorantka sugeruje zasadność oznaczania stężenia rytuksymabu i aktywności cytotoksycznej zależnej od dopełniacza u chorych, co może przyczynić się do **personalizacji przebiegu leczenia**.

**Publikacja 3 (Brit. J. Haematol.)**, jako „editorial comment” stanowi krótki ale bardzo interesujący przegląd informacji dotyczących leczenia nowotworów związanych z linią limfocytów B za pomocą przeciwciał skierowanych przeciwko antygenowi CD20, uzupełniony komentarzem Autorów odnoszącym się do perspektyw rozwoju tego typu terapii. Przeciwciała przeciwnowotworowe mogą bezpośrednio indukować programowalną śmierć komórki docelowej lub inicjować procesy takie jak cytotoksyczność komórkowa zależna od przeciwciał czy wspomniana wcześniej cytotoksyczność zależna od dopełniacza. Opierając się na analizie swoistości przeciwciał terapeutycznych, mechanizmów ich działania oraz osiągnięć ale także ograniczeń w skuteczności leczenia przy ich użyciu, Autorzy sugerują zasadność modyfikacji regionów innych niż CDR czyli tych, bezpośrednio odpowiedzialnych za rozpoznawanie epitopów, co w ich ocenie mogłoby skutkować poprawą efektywności terapii.

**W Publikacji 4 (Cancer Immunol. Immunother.)**, Pani mgr Anna Felberg-Miętka wraz z Współautorami zaproponowała wykorzystanie w terapii przeciwnowotworowej zmodyfikowanego czynnika B, którego fragment Bb wchodzi w skład konwertaz C3 i C5 drogi alternatywnej aktywacji dopełniacza. Mutacje typu „wzmocnienia funkcji” (gain of function, GOF) genu *CFB* (nie mutacje białka, jak pisze Doktorantka), prowadzące do podwyższenia aktywności konwertaz znane są jako przyczyny chorób takich jak nietypowy zespół hemolityczno-mocznicowy (aHUS) czy glomerulopatie C3, związane z zależnym od dopełniacza uszkodzeniem komórek gospodarza. Hipoteza Autorów pracy zakładała, że mutacje p.D279G, p.F286L, p.K323E i p.Y363A mogą z drugiej strony nasilać efekt terapeutyczny rytuksymabu i ofatumumabu (wspomnianych wcześniej przeciwciał przeciwko CD20) na drodze pętli amplifikacji. Założenie to zostało zweryfikowane między innymi w badaniach cytotoksyczności ofatumumabu w obecności zmodyfikowanego czynnika B, w których potwierdzono znaczne nasilenie efektu bójczego w stosunku do komórek opornych i średniowrażliwych. **Badania te są kolejnym przykładem wykorzystania własnej metody z użyciem kalceiny**. Nie można wykluczyć, że stosowanie zmodyfikowanego czynnika B może prowadzić do rozwoju powikłań związanych z nadmierną aktywacją dopełniacza, jednak uzyskane, bardzo obiecujące wyniki, mogą przyczynić się do **zoptymalizowania procesu leczenia niektórych nowotworów i obniżenia dawek przeciwciał**, co oczywiście będzie wymagało dokładnych, wieloetapowych badań. Efekt wzmocnienia uzyskano za pomocą czynników zmodyfikowanych zarówno w 1 pozycji (kodony 279, 286 lub 323), jak i z sekwencją zmienioną w 4, wspomnianych wyżej miejscach. Co ważne, Autorzy uzyskali **ochronę patentową** swojego, niewątpliwie bardzo ważnego osiągnięcia. Należy wspomnieć, że zespół kierowany przez Prof. Marcina Okroja prowadził z powodzeniem także badania mutacji typu GOF genu kodującego czynnik C2, niezbędny dla utworzenia konwertazy drogi klasycznej i lektynowej. W badaniach tych uczestniczyła także Doktorantka.



Badania, których wyniki zostały opisane w **Manuskrypcie 5** zrealizowane zostały częściowo dzięki stażowi zagranicznemu Mgr Anny Felberg-Miętki. Prace te wykazały między innymi odwrotną korelację intensywności immunobarwienia w kierunku czynnika I, będącego inhibitorem aktywacji dopełniacza, z czasem przeżycia wolnego od progresji i czasem przeżycia zależnym od nowotworu u chorych na niedrobnokomórkowe raki płuc (rak gruczołowy, płaskonabłonkowy) – mimo braku korelacji z takimi parametrami jak np. rozmiar guza czy stopień zaawansowania choroby. **Bardzo ciekawe wyniki otrzymano dzięki porównaniu właściwości komórek linii nowotworowej niezmodyfikowanych i z wyłączoną ekspresją genu dla czynnika I.** Obok znaczących różnic transkryptomów, zaobserwowano, że komórki modyfikowane tworzą mniejsze kolonie i wykazują odmienną niż komórki typu „dzikiego” aktywność migracyjną. **Wyniki te mogą potwierdzić istotny wpływ czynnika I syntezowanego przez komórki rakowe na właściwości guza (i prawdopodobnie jego mikrośrodowiska), a tym samym – na rokowania dla chorego.**

W rozdziale „Podsumowanie i dyskusja”, Doktorantka omówiła w skrócie najważniejsze osiągnięcia udokumentowane w rozprawie. Szczególnie interesujący fragment obejmuje rozważania dotyczące terapeutycznego wykorzystania zmienionych pod wpływem mutacji GOF czynników B i C2 (niebędącego przedmiotem rozprawy).

**Bardzo wysoki poziom merytoryczny artykułów wchodzących w skład rozprawy oraz rzeczowe wprowadzenie i krytyczne omówienie otrzymanych wyników świadczą o umiejętności prowadzenia badań i dojrzałości naukowej Mgr Anny Felberg-Miętki.** Należy również pokreślić możliwy **aspekt praktyczny przeprowadzonych badań.** Podczas lektury przedstawionej rozprawy pojawia się także kilka uwag, pytań i wątpliwości, o których przedyskutowanie proszę Doktorantkę:

- Na str. 11, Autorka pisze:

„Dwie pierwsze wymagają obecności odpowiednich stymulantów. W przypadku ścieżki klasycznej są to przeciwciała wiążące się z błoną komórki docelowej, a w przypadku ścieżki lektynowej lektyna wiążąca mannozę (ang. mannose binding lectin, MBL) oraz fikoliny”.

Stwierdzenie to wydaje się nieco nieprecyzyjne: jeśli za stymulant (lepiej: aktywator lub czynnik inicjujący) uznamy kompleks antygeny z przeciwciałem (antygen niekoniecznie musi wchodzić w skład błony komórki docelowej), to dla drogi lektynowej powinien to, przez analogię, być wielocukier/glikokoniugat (np. na powierzchni komórki); z drugiej strony, jeśli za aktywator dopełniacza na drodze lektynowej uznamy MBL lub fikolinę, to dla drogi klasycznej, również przez analogię, powinien być to czynnik C1q. Najlepiej byłoby uznać, że aktywację drogi klasycznej inicjuje kompleks C1q z proteazami C1r i C1s, a lektynowej – kompleks kolektyny lub fikoliny z proteazami MASP. Obecność proteaz serynowych jest tu kluczowa dla powstania konwertazy C3. Warto również pamiętać, że MBL nie jest jedyną kolektyną inicjującą aktywację dopełniacza na drodze lektynowej.

- Również na str. 11, Doktorantka wspomina:

„Niezależnie od sposobu aktywacji wszystkie trzy ścieżki prowadzą do wytworzenia enzymu konwertazy C3, która rozkłada składnik C3 do biologicznie aktywnych fragmentów C3a i C3b.” W tym miejscu należałoby wspomnieć, że konwertaza dla C3 drogi alternatywnej jest inna niż konwertaza drogi klasycznej i lektynowej. Problem ten jest wyjaśniony dalej, na str. 15.



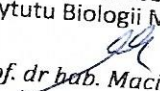
- Na str. 9, wśród konsekwencji aktywacji dopełniacza, Autorka wymienia rozwój reakcji anafilaktycznej. Inną konsekwencją, o podobnych efektach lecz nieco odmiennym podłożu może być reakcja anafilaktoidalna – proszę o krótkie omówienie podstawowej różnicy między wstrząsem anafilaktycznym i anafilaktoidalnym,
- Jedną z ważnych właściwości dopełniacza, mogącą mieć zarówno korzystne, jak i niekorzystne dla gospodarza skutki, jest pętla amplifikacji, łącząca aktywację drogi alternatywnej z pozostałymi, o czym Doktorantka wspomina na str. 15. Chciałbym zapytać o zjawisko „cross-talk” zachodzące pomiędzy aktywacją dopełniacza na drodze lektynowej i alternatywnej we wcześniejszym etapie.
- Opis antygeny CD20 i swoistych dla niego przeciwciał (str. 14) wydaje się nieco zbyt zdawkowy: Autorka wspomina na przykład, że przeciwciała typu III łączą cechy typów I i II, nie precyzuje jednak które to cechy – proszę o krótki komentarz.
- Ostatnio publikowane są doniesienia dotyczące wewnątrzkomórkowej aktywacji dopełniacza. Mam prośbę o krótkie omówienie jej potencjalnego znaczenia w rozwoju nowotworów.
- Rozprawa nie jest wolna od pewnej liczby błędów redakcyjnych, jak np. niestosowanie polskich znaków, brak wyjaśnienia niektórych skrótów, nieprawidłowe użycie małych liter (w spisie cytowanych publikacji, np. cd20, c2, c3, cll, nhl) czy użycie terminu „zmutowane białko”. Błędy te, których szczegółowy wykaz został przekazany Doktorantce, nie wpływają znacząco na wspomnianą wcześniej, **bardzo wysoką wartość naukową** pracy.

Rozprawa zatytułowana „Znaczenie układu dopełniacza w powstawaniu nowotworów oraz w terapii przeciwnowotworowej” stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego i spełnia wymagania dotyczące rozpraw doktorskich zawarte w Ustawie o stopniach naukowych i tytułach naukowych oraz o stopniach i tytułach w zakresie sztuki. W związku z powyższym, zwracam się do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauki Biologicznej Uniwersytetu Gdańskiego z wnioskiem o dopuszczenie Pani mgr Anny Felberg-Miętki do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora nauk ścisłych i przyrodniczych, w dyscyplinie nauki biologiczne.

Wnioskuje również o **wyróżnienie rozprawy**, z uwagi na:

- szeroki zakres przeprowadzonych badań i wartość uzyskanych wyników (potwierdzoną rangą publikacji włączonych do rozprawy; Doktorantka jest samodzielną lub równorzędną pierwszą autorką tych artykułów)
- aspekt praktyczny pracy (np. wskazanie kierunków badań służących polepszeniu skuteczności leczenia niektórych nowotworów i personalizacji terapii)
- opracowanie nowej metody badania cytotoksyczności.

Z wyrazami szacunku,

KIEROWNIK  
Pracowni Immunobiologii Zakażeń  
Instytutu Biologii Medycznej PAN  
  
Prof. dr hab. Maciej Cedzyński