

Prof. dr hab. nauk med. Magdalena Łętowska

Katedra Hematologii i Transfuzjologii CMKP

02-776 Warszawa

Indiry Gandhi 14

Recenzja pracy na stopień doktora nauk medycznych

Lek. ALANA MAJERANOWSKIEGO

pt. „Modulacja cytotoksyczności zależnej od dopełniacza przeciwciał anti-CD20 w kontekście współczesnej immunoterapii nowotworów limfoproliferacyjnych”

Układ dopełniacza (układ komplementu) składa się z ponad 30 białek i stanowi element nieswoistej odpowiedzi immunologicznej, biorąc udział w obronie organizmu przez czynnikami infekcyjnymi i odgrywa istotną rolę w procesie usuwania obumarłych komórek oraz kompleksów immunologicznych. Stanowi także ważny mechanizm efektorowy immunoterapii opartej na przeciwciałach monoklonalnych stosowanych w leczeniu chorób limfoproliferacyjnych. W przypadku przeciwciał skierowanych przeciwko antygenowi CD20, aktywacja klasycznej drogi dopełniacza prowadzi do powstania konwertaz C3 i C5, a następnie do formowania kompleksu atakującego błonę. Kompleks ten tworzy por w błonie komórkowej i wywołuje lizę komórki docelowej stanowiąc atrybut cytotoksyczności zależnej od dopełniacza. Skuteczność tego mechanizmu zależy zarówno od właściwości przeciwciała, jak i od funkcjonalnego stanu układu dopełniacza oraz działania jego regulatorów. Celem recenzowanej pracy była ocena możliwości wzmocnienia aktywacji układu dopełniacza przez terapeutyczne przeciwciało anti-CD20 obinutuzumab poprzez zastosowanie hiperaktywnego wariantu składnika C2 klasycznej drogi dopełniacza.

Obinutuzumab należy do przeciwciał anti-CD20 typu II, które wykazują wysoką zdolność indukcji mechanizmów zależnych od receptorów Fcy, takich jak cytotoksyczność komórkowa zależna od przeciwciał oraz fagocytoza zależna od przeciwciał, a także bezpośredniego indukcji śmierci komórkowej, przy jednocześnie ograniczonej zdolności do aktywacji dopełniacza.

W pracy przyjęto hipotezę, że modulacja aktywności elementów kaskady dopełniacza na poziomie konwertaz może zwiększyć udział cytotoksyczności zależnej od dopełniacza w działaniu tego przeciwciała.

W związku z powyższym, wybrany przez Doktoranta temat rozprawy doktorskiej, dotyczący modulacji cytotoksyczności zależnej od układu dopełniacza przeciwciał anty-CD20 w kontekście współczesnej immunoterapii nowotworów limfoproliferacyjnych, zaliczyć należy do tematów bardzo istotnych w aspekcie nie tylko poznawczym, ale mającym niezwykle istotne implikacje kliniczne.

1. Poprawność redakcyjna rozprawy

Praca oceniana na stopień doktora nauk medycznych liczy 141 stron, ma układ nietypowy i składa się z 10 części, w skład których poza spisem treści, wykazem skrótów, streszczeniem w języku polskim i angielskim, bibliografią i spisu tabel i rycin, wchodzi: bardzo obszerna Część teoretyczna (wstęp), dwie części badawcze, z których każda składa się z: omówienia celu badawczego, materiału i metod zastosowanych w części doświadczalnej, wyników oraz krótkiej dyskusji. Po zakończeniu omawiania drugiego celu badawczego Autor umieścił rozdział Wnioski końcowe. Praca uzupełniona jest streszczeniem w języku polskim i angielskim, wykazem stosowanych skrótów, spisem rycin i tabel oraz dodatkowo rozdziałami o ograniczeniach badania, podsumowaniem i implikacjami klinicznymi. W tekście Autor umieścił 7 tabel i 10 rycin.

Piśmiennictwo jest wyczerpujące, bardzo obszerne, pochodzi przede wszystkim z okresu ostatnich piętnastu lat i składa się z 348 pozycji angielskojęzycznych. Na uwagę zasługuje fakt, że 121 pozycji pochodzi z ostatnich 10 lat, w tym 35 pozycji z ostatnich 5 lat.

2. Wartość naukowa i merytoryczna rozprawy

Wprowadzenie w tematykę badawczą jest bardzo wyczerpujące i nowocześnie napisane. Obszerny wstęp podzielony jest na 7 podrozdziałów, w których przedstawione zostały:

- Wprowadzenie do układu dopełniacza
- Jego mechanizmy regulacyjne
- Przeciwciała monoklonalne anty-CD20
- Interakcje przeciwciał anty-CD20 z układem dopełniacza

- Ich rola w nowoczesnych terapiach przeciwnowotworowych
- Nowe kierunki ich rozwoju w leczeniu
- Rola białka C2 w układzie dopełniacza.

Część teoretyczna (wstęp) dotyczy celowości wybranego tematu, odpowiada współczesnemu stanowi wiedzy i oparta jest o aktualne piśmiennictwo.

Cele pracy Doktorant sformułował przejrzyście, planując:

- Optymalizację metod oznaczania cytotoksyczności zależnej od układu dopełniacza w warunkach *in vitro* poprzez dobranie odpowiedniego czasu inkubacji oraz wybranie metody detekcji umożliwiającej szybki i powtarzalny odczyt poprzez porównanie trzech strategii oznaczania cytotoksyczności stanowiących: test cytometryczny z wykorzystaniem jodku propidyny, test metaboliczny oparty na redukcji rezazuryny oraz test uwalniania kalceiny. Na podstawie uzyskanych wyników wybrana została metoda charakteryzująca się najwyższą wiarygodnością pomiaru.
- Ocenę wpływu rekombinowanego wariantu typu gain-of-function składnika C2 układu dopełniacza na cytotoksyczność zależną od dopełniacza indukowaną przez przeciwciała anti-CD20 (rytuksymab i obinutuzumab) wobec komórek przewlekłej białaczki limfocytowej.

Część badawcza pracy (materiał, stosowane metody, wyniki i ich omówienie) została podzielona na dwie części (Część badawcza I i Część badawcza II).

Każda z tych części składa się z omówienia celu, stosowanych metod, wyników i dyskusji.

W recenzowanej pracy wykorzystane zostały wyniki przedstawione w następujących publikacjach, których współautorem jest Autor ocenianej pracy:

- 1) Alan Majeranowski, Grzegorz Stasiłojć, Nadia Panasiuk, Marcin Okrój Selection of laboratory assays for reliable assessment of complement-dependent cytotoxicity: impact of assay choice on CDC quantification. Front Immunol. 2026; 17:1786368. doi.org/10.3389/fimmu.2026.1786368
- 2) Aleksandra Urban, Alan Majeranowski, Grzegorz Stasiłojć, Patrycja Koszałka, Anna Felberg, Michał Taszner, Jan M. Zaucha, Marcin Okrój In silico designed gain-of-function variants of

complement C2 support cytotoxic activity of anticancer monoclonal antibodies. *Cancers* (Basel). 2022; 14:1270. doi.org/10.3390/cancers14051270

3) Alicja Kuźniewska, Alan Majeranowski, Sara Henry, Daria Kowalska, Grzegorz Stasiłojć, Aleksandra Urban, Jan M Zaucha, Marcin Okrój The acquisition of complement-dependent cytotoxicity by the type II anti-CD20 therapeutic antibody obinutuzumab. *Cancers* (Basel). 2023;16: 49. doi.org/10.3390/cancers16010049.

4) Anna Felberg, Michał Taszner, Aleksandra Urban, Alan Majeranowski, Kinga Jaskuła, Aleksandra Jurkiewicz, Grzegorz Stasiłojć, Anna M. Blom, Jan M. Zaucha, Marcin Okrój Monitoring of the Complement System Status in Patients With B-Cell Malignancies Treated with Rituximab. *Front Immunol*. 2020;11: 584509. doi.org/10.3389/fimmu.2020.584509.

Wyniki części badawczej I zostały poprzedzone omówieniem pierwszego celu, opisaniem zastosowanych technik badań i przedstawione na dwóch rycinach (5 i 6), oddzielnie dla oceny cytotoksyczności zależnej od układu dopełniacza indukowanej przez rytuksymab w komórkach linii Ramos (rycina 5), oraz w komórkach linii Raji (rycina 6), z wykorzystaniem trzech komplementarnych metod analitycznych [test uwalniania kalceiny, test PrestoBlue HS, test inkorporacji jodku propidyny (PI)]. Analizę przeprowadzono z wykorzystaniem linii komórkowych *Raji* i *Ramos*, różniących się wrażliwością na atak układu dopełniacza. Następnie, uzyskane wyniki zostały zbiorczo opisane, po nich nastąpiła krótka dyskusja omawiająca uzyskane wyniki. Na podstawie uzyskanych wyników, do przeprowadzenia badań w części badawczej II, oceniających cytotoksyczność zależną od składników układu dopełniacza, wytypowany został test uwalniania kalceiny charakteryzujący się najwyższą wiarygodnością pomiaru.

Wyniki części badawczej II, podobnie jak w pierwszej części badawczej, po omówieniu drugiego celu, Autor wyjaśnił, dlaczego komórki przewlekłej białaczki limfocytowej stanowią odpowiedni model badawczy do analizy mechanizmów cytotoksyczności zależnej od składników układu dopełniacza indukowanej przez przeciwciała lecznicze. Następnie w Tabeli 7, Autor przedstawił dane kliniczne i laboratoryjne 20 pacjentów włączonych do badania (była to typowa populacja pacjentów leczonych w ośrodku hematologicznym), zastosowany materiał i metody badawcze. Wynik tej części przedstawione zostały na czterech rycinach (7-10), następnie omówione w rozdziale „Dyskusja części badawczej II”.

W tym etapie przeprowadzonych badań okazało się, że potencjalny funkcjonalny niedobór układu dopełniacza u pacjentów z przewlekłą białaczką limfocytową nie wpływa istotnie na podstawową aktywność cytotoksyczną zależną od dopełniacza indukowaną przez same komórki białaczkowe (rycina 7). Zastosowanie hiperaktywnego wariantu C2 prowadziło do zwiększenia stabilności i aktywności klasycznej konwertazy C3, co skutkowało nasileniem cytotoksyczności zależnej od dopełniacza w modelach komórkowych. Efekt ten obserwowano zarówno w przypadku rytuksymabu, jak i obinituzumabu. W szczególności wykazano, że wzmocnienie aktywności konwertaz umożliwiało uzyskanie mierzalnej aktywności cytotoksycznej zależnej od białek układu dopełniacza również w przypadku przeciwciała typu II, wykazującego w warunkach standardowych ograniczoną zdolność do aktywacji tej kaskady.

Pilotażowa analiza fenotypowa komórek przewlekłej białaczki limfocytowej (n=5) nie wykazała jednoznacznej zależności pomiędzy poziomem ekspresji antygenu CD20 ani pomiędzy ekspresją błonowych regulatorów dopełniacza, takich jak CD46, CD55 i CD59, a podatnością komórek na wzmocnienie cytotoksyczności zależnej od dopełniacza. Dlatego nie kontynuowano badania pozostałych próbek pochodzących od kolejnych pacjentów (rycina 8).

Jednocześnie stwierdzona została istotna statystycznie, dodatnia korelacja pomiędzy nasileniem limfocytozy a stopniem cytotoksyczności zależnej od układu dopełniacza obserwowanej po zastosowaniu hiperaktywnego wariantu C2 (rycina 9).

Eksperyment przeprowadzony na komórkach linii *Raji* w warunkach krwi pełnej (liczba dawców=3) wykazał wyraźne nasilenie cytotoksyczności zależnej od układu dopełniacza indukowanej przez obinituzumab (rycina 10). Te wyniki przeprowadzone na niewielkiej liczbie próbek mogą sugerować, że w kontekście ograniczonej cytotoksyczności, obinituzumab może efektywnie wykorzystywać aktywację układu dopełniacza jako dodatkowy mechanizm efektorowy w fizjologicznym środowisku krwi pełnej.

Przeprowadzone badania wykazały, że skuteczność aktywacji układu dopełniacza w immunoterapii przeciwciałami anti-CD20 nie zależy wyłącznie od charakterystyki etapu inicjacji kaskady, co było dotychczas ugruntowanym poglądem i determinantą podziału przeciwciał anti-CD20 na przeciwciała typu I i II, lecz może być skutecznie modulowana na poziomie konwertaz. Wzmocnienie aktywności tych kompleksów enzymatycznych prowadzi

do zwiększenia cytotoksyczności zależnej od dopełniacza indukowanej przez przeciwciała terapeutyczne obydwu typów.

Wnioski końcowe zostały przedstawione opisowo. Wnioski dotyczące części badawczej I Autor przedstawił w dyskusji, natomiast nie zostały one umieszczone w tym rozdziale.

3. Uwagi końcowe

Ogólnie pracę lek. Alana Majeranowskiego oceniam pozytywnie. Podjęty temat, zastosowane metody badawcze, dobór piśmiennictwa wskazują na dobre przygotowanie Doktoranta do pracy naukowej.

Natomiast z obowiązku recenzentki miałabym do Doktoranta kilka pytań a do jego pracy kilka uwag.

Po pierwsze, dlaczego została wybrana taka forma rozprawy doktorskiej, skoro stosownie do art. 187 ust. 3 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce, rozprawę doktorską może stanowić praca pisemna, w tym monografia naukowa, zbiór opublikowanych i powiązanych tematycznie artykułów naukowych, praca projektowa, konstrukcyjna, technologiczna, wdrożeniowa lub artystyczna, a także samodzielna i wyodrębniona część pracy zbiorowej?

Moim zdaniem znacznie stosowniejszą formą byłby **zbiór opublikowanych i powiązanych tematycznie artykułów naukowych**.

Po drugie, dlaczego wybierając taką formę rozprawy doktorskiej nie zostały zachowane przyjęte proporcje pomiędzy poszczególnymi rozdziałami? Część teoretyczna stanowi 48 stron a obydwie dyskusje 5 stron.

Po trzecie, dlaczego w pracy zostały wydzielone dwie części badawcze, skoro są one ze sobą bezpośrednio powiązane i zastosowane metody badawcze w części drugiej bezpośrednio powiązane są z wynikami części pierwszej?

Po czwarte, dlaczego wnioski końcowe rozprawy nie zawierają wniosków z pierwszej części badawczej?

Po piąte, dlaczego w eksperymencie dotyczącym zastosowania modelu krwi pełnej Autor ograniczył się tylko do trzech próbek?

Z uwag do przedstawionej do recenzji rozprawy chciałabym zwrócić uwagę na stosowanie skrótu dopełniacz w miejsce układ dopełniacza. Można było na początku rozprawy umieścić informację o stosowanym skrócie.

W pracy znalazło się kilka nieprawidłowo stosowanych zapisów lub sformułowań np.:

na stronie 33 ... z badań van Meertrn i wsp. ..." powinno być: z badań Meertena i wsp. (Tom Meerten)

na stronie 49 ...podanie leków sterydowych... powinno być: kortykosteroidów. Leki sterydowe to określenie ogólne i potoczne.

na stronie 74 zamiast „Do analizy cytometrycznej pobierania propidium jodku (PI)” powinno być: jodku propidyny.

A także na stronie 132 umieszczona została pod numerem 261 i 262 ta sama publikacja Bacac M. i wsp. Poza tym w tekście znalazły się błędy literowe.

4. Podsumowanie i ocena końcowa

Pragnę wyraźnie podkreślić, że przedstawione powyżej uwagi mają ograniczony wpływ na wartość przedstawionej do recenzji pracy. Zapewne zostaną one skorygowane przed dalszymi etapami kontynuowania i przedstawiania wyników przeprowadzonych badań.

W rozprawie Autor przeprowadził w sposób właściwy analizę literatury, w tym literatury światowej, co świadczący o głębokiej wiedzy Autora na temat badanego zagadnienia. Raz jeszcze pragnę wspomnieć, że literatura cytowana w pracy jest obszerna, prawidłowo zestawiona i uwzględnia najnowsze pozycje. Autor zastosował nowoczesne techniki badawcze, realizując przyjęte założenia. Pragnę dodać, że praca napisana jest bardzo ładnym językiem i czyta się ją z ogromnym zainteresowaniem.

Podsumowując stwierdzam, że recenzowana rozprawa doktorska lek. Alana Majeranowskiego spełnia warunki określone w art. 187 ustawy Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2024 r. poz. 1571), a tym samym stawiane rozprawom doktorskim na stopień doktora nauk medycznych, a zaprezentowana przeze mnie ocena upoważnia mnie do skierowania do Wysokiej Rady wniosku o dopuszczenie lek. Alana Majeranowskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Warszawa 18 sierpnia 2026 roku

 **PODPIS ZAUFANY**
MAGDALENA KATARZYNA
ŁĘTOWSKA
20.08.2026 14:13:08 GMT+0200
Dokument podpisany elektronicznie
podpisem zaufanym