

**Opinia dotycząca "osiągnięcia" naukowego, dorobku naukowego, dydaktycznego i działalności organizacyjnej dr n. chem. Doroty Iwaszkiewicz-Grześ**

Dr Dorota Iwaszkiewicz-Grześ ukończyła studia wyższe na Wydziale Chemicznym Politechniki Gdańskiej w 2010 roku i uzyskała tytuł zawodowy magistra inżyniera. Promotorem pracy magisterskiej pt. "Synteza kombretastatyny A-4" była prof. dr hab.chem. Krystyna Dzierzbicka. Stopień naukowy doktora nauk chemicznych uzyskała w 2014 roku na Wydziale Chemicznym Politechniki Gdańskiej na podstawie rozprawy pt "Synteza i badania biologiczne nowych aminokwasowych analogów kwasu mykofenolowego". Promotorami rozprawy byli prof. dr hab. inż. Krystyna Dzierzbicka oraz prof. dr hab. Piotr Trzonkowski. Rozprawa doktorska powstała w ramach Dziennych Studiów Doktoranckich Politechniki Gdańskiej w Katedrze Chemii Organicznej. Od lutego 2016 do chwili obecnej zatrudniona jest w Katedrze i Zakładzie Immunologii Medycznej na Wydziale Lekarskim Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, najpierw jako adiunkt pracownik naukowy a następnie badawczo - dydaktyczny. Od maja 2018 roku Dr Dorota Iwaszkiewicz-Grześ pracuje jako biotechnolog, lider ds. Badań i Rozwoju w spółce spin-off "PolTREG S.A." Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego.

**Osiągnięcie naukowe**

Prace wykorzystane do prezentacji osiągnięcia naukowego powstały w wyniku realizacji projektów NCBiR: LIDER(160/L-6/14/2015) oraz STRATEGMED1(233368/1/2014). W pierwszym Habilitantka była kierownikiem w drugim zaś koordynatorem zadania 4. Osiągnięcie naukowe zatytułowane. "Udoskonalanie terapii komórkowej limfocytami T regulatorowymi w chorobach autoimmunologicznych" dotyczy bardzo ciekawego zagadnienia z pogranicza immunologii, inżynierii tkankowej i transplantologii. Próby leczenia eksperymentalnego przy pomocy przeszczepiania naturalnych limfocytów T regulatorowych trwają od 1995 roku, tj. od czasu potwierdzenia hipotezy o ich istnieniu. Leczenie przy pomocy Treg testowano na zwierzęcych modelach chorób autoimmunologicznych, cukrzycy typu 1 i stwardnienia rozsianego. Jednym z podstawowych ograniczeń wprowadzenia takich terapii u ludzi jest konieczność zastosowania dużej liczby komórek o zaplanowanym fenotypie, co przy dość skąpo występujących limfocytach regulatorowych *in vivo* jest nie lada wyzwaniem. Limfocyty Tregs wykorzystywane są jako lek



komórkowy i obecnie przeprowadzone są badania kliniczne, dotyczące zapobiegania chorobie przeszczep przeciwko gospodarzowi (GVHD)<sup>30</sup>, autoimmunizacji oraz indukcji tolerancji po allotransplantacji. Przedmiotem ocenianego cyklu habilitacyjnego są badania nad biologią i klinicznym zastosowaniem Tregs w stanach autoimmunologicznych, takich jak cukrzyca typu 1 i stwardnienie rozsiane. Habilitantka postawiła sobie za cel zbadać efektywność i bezpieczeństwo działania poliklonalnych limfocytów Tregs w stwardnieniu rozsianym oraz wpływu miejsca administracji komórek na rozwój choroby, opracować metodę otrzymania antygenowo-specyficznym limfocytów Tregs na przykładzie cukrzycy typu 1, porównać efektywność działania antygenowo-specyficznym i poliklonalnych limfocytów Treg oraz dokonać molekularnej oceny otrzymanych antygenowo-specyficznym i poliklonalnych limfocytów T reg.

W pierwszej publikacji pt. *Administration of CD4+CD25highCD127-foxp3+ regulatory T cells for relapsing-remitting multiple sclerosis: a phase I study* (BioDrugs, 2021, 35, 47-60) Habilitantka badała bezpieczeństwo i efektywności poliklonalnych limfocytów T regulatorowych podanych pacjentom ze stwardnieniem rozsianym oraz porównanie miejsca administracji preparatu, wlewu dożylnego oraz dokanałowego na postęp SM. Zaburzenia pomiędzy populacjami Tregs i autouczulonymi limfocytami T sterują procesem automimunizacji a ponieważ odnotowano akumulację komórek Tregs w płynie mózgowo-rdzeniowym, a nie we krwi pacjentów w okresie remisji, wysunięto śmiałą hipotezę dotyczącą wpływu miejsca podania komórek Tregs. Do badania włączono pacjentów z rzutowo-remisyjną postacią SM, którzy zostali losowo przydzieleni do dożylnego lub dokanałowego podania preparatu. Czternastu pacjentów z SM (18-55 lat) zostało włączonych do badania oraz podzielonych na grupę leczoną komórkami Tregs dożylnie (grupa IV, n=11) lub dokanałowo (podpajęczynówkowo) (grupa IT, n=3). Pacjentów obserwowano przez rok po podaniu preparatu. W celu podania dożylnego, namnażanie komórek prowadzono do uzyskania ostatecznej dawki 40 mln komórek Tregs na kg masy ciała pacjenta. W podaniu dokanałowym zastosowano milion świeżo wyizolowanych komórek Tregs. Habilitantka obserwowała interesujące zależności podczas śledzenia populacji Tregs, jak i Tconv we krwi obwodowej. W obu populacjach śledziła ekspresję antygenów ważnych dla pełnienia funkcji. Określiła też odsetki komórek naiwnych/pamięci w oparciu o następujące fenotypy: naiwne (Tn), pamięci centralnej (Tcm) i pamięci efektorowej (Tem). Komórki Tregs podzieliła również na podstawie ekspresji czynnika transkrypcyjnego Helios. Oceniono również poziomy 38 cytokin w surowicy. Komórki Tregs różniły się od Tconv, niezależnie od drogi administracji preparatu, co ciekawe Tregs zawierały głównie fenotyp Tcm, podczas gdy Tconv zawierały głównie fenotyp Tn. Komórki Tregs charakteryzowały się ekspresją kilku receptorów, m.in. CCR10, CXCR4, CCR4, CD103, CD39, CTLA-4 i 4-1BB, które były prawie niewykrywalne w komórkach Tconv. Komórki Tregs grasicy zawierała wyższy odsetek komórek CCR10<sup>+</sup>, CD103<sup>+</sup>, CD73<sup>+</sup> i CD39<sup>+</sup>, podczas gdy obwodowe



Tregs zawierały wyższy odsetek komórek CTLA-4. Osoby leczone dokanałowo (IT) wykazywały wyższe poziomy niektórych czynników związanych z zapaleniem, jak i mózgowego czynnika troficznego TGF $\alpha$  w grupie IT niż w IV. W grupie IV trzech na dziesięciu badanych (30%) miało pogorszenie powyżej 1 punktu w skali EDSS. Takiego pogorszenia nie zaobserwowano u osób leczonych dokanałowo (0%). W sumie u 5 chorych leczonych dożylnie (50%), z częstością 1–3 epizodów rocznie w okresie obserwacji, odnotowano 12 nawrotów. Jednocześnie nie zaobserwowano nawrotów w grupie IT (0%). Również porównanie skanów MRI wykazało niższą aktywność choroby w grupie leczonej dokanałowo.

Bardzo podoba mi się świetnie zaplanowane i zrealizowane badanie kliniczne, dzięki któremu możemy mieć podstawy do dalszych prac nad etiologią i leczeniem SM.

W drugiej publikacji pt. *Antigen-reactive regulatory T cells can be expanded in vitro with monocytes and anti-CD28 and anti-CD154 antibodies* (Cytotherapy, 2020, 22, 629-641) Habilitantka zaprezentowała metodę otrzymywania antygenowo-specyficznych limfocytów Treg, które porównała do tych o charakterze poliklonalnym, które są obecnie używane w leczeniu cukrzycy typu 1 u dzieci oraz eksperymentalnie w przypadku stwardnienia rozsianego. Habilitantka w zaprezentowała swój świetny warsztat pracy prezentując izolację magnetyczną limfocytów, ich sortowanie na limfocyty Treg o fenotypie CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>CD127<sup>-</sup>lin<sup>-</sup>doublet<sup>-</sup> oraz limfocyty T efektorowe (Teffs) o fenotypie CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>CD127<sup>+</sup>lin<sup>-</sup>doublet<sup>-</sup>, stymulację monocytów za pomocą wybranego antygeny, oznaczanie proliferacji otrzymanych komórek, metody hodowli łączonych Tregs/monocyty, Teffs/monocyty oraz hodowli poliklonalnych, izolacji komórek antygenowo-specyficznych, a także testy funkcjonalne w celu porównania aktywności otrzymanych populacji.

Otrzymane wyniki pokazały, że najlepsze rezultaty otrzymano stymulując Tregs za pomocą monocytów prezentujących antygen oraz przeciwciałami anti-CD28/anti-CD154. Jednocześnie, w porównaniu z całą insuliną, stymulacja peptydem 9-23 doprowadziła do znacznie wyższego odsetka proliferacji, co prawdopodobnie jest związane z wyższym poziomem immunogenności tego fragmentu. Otrzymane komórki analizowano pod kątem ich zdolności supresorowych w testach funkcjonalnych mierzących stopień proliferacji oraz wydzielania interferonu gamma (IFN $\gamma$ ), wykazując efekty ekspozycji na insulinę oraz peptyd 9-23. Dodatkowo zsekwencjonowano łańcuchy receptora komórek T $\alpha$  (TCR $\alpha$ ) w celu określenia różnic repertuaru TCR populacji poliklonalnych oraz antygenowo-specyficznych, z których te ostatnie po stymulacji całą insuliną lub peptydem 9-23 zawierały mniej klonotypów niż limfocyty poliklonalne i niespecyficzne.

Jestem pełen podziwu dla warsztatu pracy Habilitantki. Sposób izolacji Tregs rozpoznających antygeny ważne w cukrzycy typu 1 (T1D), mianowicie insulinę lub fragment 9–23 łańcucha  $\beta$  insuliny może być również wykorzystany do wytwarzania preparatu o swoistości wobec dowolnego



innego autoantygeny i zastosowana w leczeniu innych chorób. Co więcej metoda została opatentowana i wyróżniona Nagrodą Oddziału PAN w Gdańsku dla młodych naukowców za najlepszą pracę twórczą opublikowaną w 2020 r.

W trzeciej publikacji pt. *Antigenic challenge influences epigenetic changes in antigen-specific T regulatory cells* (Frontiers in Immunology, 2021,12:642678) Habilitantka kontunuje prace nad charakterystyką zmian epigenetycznych antygenowo-specyficznych limfocytów Treg. Do przeprowadzonego badania wybrano kilka genów (*Foxp3*, *Ctla-4*, *Ikzf-2*, *Ikzf-4*, *Tnfrsf18*, *Tet2* i *Runx1*), ocenę metylacji regionu TSDR oraz modyfikacji histonów H3 PTM. Nie jest to może tak nowatorska publikacja jak dwie poprzednie, ale doskonale wpisuje się w zaprezentowane osiągnięcie naukowe a co ważniejsze jest konieczna w procesie tworzenia produktów leczniczych. Habilitantka pokazała, że stymulacja antygenami insuliny lub peptydem 9-23 łańcucha  $\beta$  insuliny powoduje zmiany epigenetyczne w limfocytach Treg oraz że rodzaj stymulacji determinuje poziom zmian metylacji DNA, swoistej metylacji regionu TSDR oraz modyfikacji histonów H3 PTM. Peptyd 9-23 łańcucha  $\beta$  insuliny promuje głównie zmiany zorientowane na Tregs, podczas gdy fenotyp po stymulacji insuliną był mniej wyraźny. Dodatkowo, komórki specyficzne wobec peptydu 9-23 charakteryzowały się wysoką ekspresją kluczowych genów oraz najwyższym poziomem demetylacji, co wpływa na ich lepsze właściwości supresorowe. Wykazała, że protokół pozwalający na uzyskanie antygenowo specyficznych limfocytów T regulatorowych jest obiecującą strategią terapii komórkowej, m.in. w cukrzycy typu 1. Publikacja została nagrodzona „Nagrodą Specjalną Rektora Gdańskiego Uniwersytetu medycznego” w 2021 roku.

Reasumując osiągnięcie naukowe dr Iwaszkiewicz-Grześ jest niezwykle ciekawe. Posiada wiele aspektów praktycznych, jest w nim badanie kliniczne pierwszej fazy, zgłoszenie patentowe, finansowanie przez poważne instytucje krajowe, bardzo rozbudowany warsztat naukowy, mocny motyw przewodni, którego osią jest leczenie chorób autoimmunologicznych. To wszystko powoduje, że czyta się to opracowanie z wielką przyjemnością. Pozycja Zespołu naukowego, w którym Habilitantka pracuje jest w mojej ocenie niekwestionowana, wielokrotnie sam korzystałem z publikacji tego zespołu. Mogę śmiało powiedzieć, iż zasięg i wpływ tych publikacji nie ogranicza się tylko do środowisk naukowych związanych z leczeniem chorób autoimmunologicznych, w mojej ocenie jest on uniwersalny.

### **Ocena dorobku naukowego**

Według analizy bibliometrycznej na dzień 26.10.2021 całkowity sumaryczny Impact Factor Dr Iwaszkiewicz-Grześ wynosi 77,154 w tym osiągnięcia habilitacyjnego 18,782. Impact Factor przed uzyskaniem stopnia doktora wynosił 3,432. Łączna suma punktów MEiN dla całego dorobku wynosi 1194, w tym osiągnięcie habilitacyjne to 340 punktów. Liczba cytowań według Web of



Science wynosi 218 (187 bez autocytowań) według SCOPUS 225 (194 bez autocytowań), co przekłada się na Index Hirscha 8 obliczany na podstawie obu baz bibliograficznych. Dr Iwaszkiewicz-Grześ przedstawiała doniesienia na 26 kongresach i sympozjach naukowych. Jest współwłaścicielem 3 patentów.

Praca naukowa Habilitantki dotyczy zgadnień z zakresu immunologii oraz inżynierii tkankowej. Początkowo skupiła się na pochodnych kwasu mykofenolowego (MPA), które wykorzystywane są jako leki immunosupresyjne lub w leczeniu chorób z autoagresji. W trakcie prowadzonych badań skupiła się nad otrzymaniem aminokwasowych pochodnych MPA oraz badaniu ich aktywności biologicznej, z wykorzystaniem linii komórkowych Jurkat, MOLT-4 oraz krwi obwodowej. Badania te pozwoliły na opublikowanie pracy "Synthesis and biological activity of mycophenolic acid-amino acid derivatives" i potwierdziły hipotezę, iż utworzenie wiązania amidowego oraz dołączenie odpowiednich grup aminokwasowych zwiększa właściwości immunosupresyjne MPA. W trakcie prac eksperymentalnych powstała również praca przeglądowa opisująca znane leki immunosupresyjne, a także nowe związki o potencjalnym zastosowaniu klinicznym, uwzględniając mechanizm ich działania oraz metody otrzymywania.

Po uzyskaniu stopnia doktora jej główne zainteresowania objęły choroby z autoagresji. Mimo to nadal współpracuje z Katedrą Chemii Organicznej Politechniki Gdańskiej. Badała aktywność biologiczną na liniach komórkowych oraz krwi obwodowej oraz wobec komórek dendrytycznych, jako komórek prezentujących antygen. W zakresie cukrzycy typu 1 (T1D) oraz stwardnienia rozsianego (SM) badała czynniki wpływające na skuteczność leczenia na komórkach Tregs w T1D oraz analizowała działanie cytokin, na zachowanie zdolności proliferacyjnych i supresorowych przez limfocyty Treg. Opracowuje sposób monitorowania odpowiedzi komórek T w badaniach translacyjnych. Uczestniczy w pisaniu prac przeglądowych, dotyczących terapii komórkowych. Tworzy zbiór wytycznych przedstawiania wyników produkcji limfocytów Treg. Współpracując z Uniwersytetem w Amsterdamie opracowuje nowy marker, GPA33, służący do identyfikacji stabilnych limfocytów Treg.

Dwukrotnie była kierownikiem projektów naukowych, jeden raz głównym wykonawcą, raz koordynatorem zadania oraz dwukrotnie wykonawcą. Orzymała 3 stypendia wyjazdowe, stypendium macierzystej uczelni i trzykrotnie nagrody specjalne rektora Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego oraz dwie nominacje do nagród ogólnokrajowych. W zakresie leczenia cukrzycy typu 1 nawiązała współpracę z Politechniką w Dreźnie (DRESDEN-concept Genome Center, Center for Molecular and Cellular Bioengineering (CMCB) oraz DFG-Center for Regenerative Therapies Dresden, Katedrą i Kliniką Pediatrii, Diabetologii i Endokrynologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, Katedrą Anestezjologii i Intensywnej Terapii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, Katedrą Medycyny Rodzinnej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, International Centre for



Cancer Vaccine Science Uniwersytetu Gdańskiego, Kliniką Pediatrii, Diabetologii, Endokrynologii i Nefrologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, Kliniką Pediatrii, Endokrynologii, Diabetologii z Pododdziałem Kardiologii Uniwersyteckiego Dziecięcego Szpitala Klinicznego im. L. Zamenhofs w Białymstoku Regionalnym Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa w Gdańsku. Badając zagadnienia dotyczące stwardniania rozsianego współpracuje z Katedrą Neurologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, Zakładem Radiologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, Zakładem Fizjologii Człowieka Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, Division of Immunology, LCMN, Germans Trias i Pujol University Hospital and Research Institute w Barcelonie (Hiszpania), Multiple Sclerosis Unit, Department of Neurosciences, Germans Trias i Pujol University Hospital w Barcelonie (Hiszpania), Department of Immunology, Institute for Biological Research "Siniša Stanković"- National Institute of Republic of Serbia, University of Belgrade w Belgradzie (Serbia), Department of Immunopathology, Sanquin Research w Amsterdamie (Holandia), Landsteiner Laboratory, Academic Medical Centre, University of Amsterdam (Holandia), San Raffaele Telethon Institute for Gene Therapy (SR-Tiget), Division of Regenerative Medicine, Stem Cells and Gene Therapy, IRCCS San Raffaele Scientific Institute w Mediolanie (Włochy) oraz MRC Centre for Transplantation, King's College London w Londynie (Wielka Brytania).

Podsumowując, aktywność naukowa Dr Iwaszkiewicz-Grześ jest spójna, mimo pracy w instytucjach o różnych profilach, jest też niezwykle interesująca, dobrze udokumentowana i zauważalna w środowisku.

### **Ocena dorobku organizacyjnego i dydaktycznego**

Podczas pracy naukowej Habilitantka cały czas prowadziła działalność dydaktyczną w ramach zajęć na Politechnice Gdańskiej jak i w Gdańskim Uniwersytecie Medycznym. W latach 2010-2014 jako doktorant prowadziła seminaria, laboratoria, ćwiczenia dydaktyczne ze studentami Technologii Chemicznej oraz Technologii Ochrony Środowiska Politechniki Gdańskiej w zakresie chemii organicznej. W latach 2016-2019 jako pracownik naukowo-badawczy asystowała w seminariach z immunologii klinicznej ze studentami Wydziału Lekarskiego GUMed. W latach 2019-2020 jako pracownik badawczo-dydaktyczny prowadziła w języku polskim i angielskim seminaria, ćwiczenia oraz laboratorium ze studentami Wydziału Lekarskiego GUMed oraz Wydziału Farmaceutycznego GUMed dotyczące immunologii klinicznej, immunopatologii i basic immunology. Od 2020 jako pracownik badawczo-dydaktyczny prowadzi w języku polskim i angielskim seminaria, ćwiczenia oraz laboratorium ze studentami Wydziału Lekarskiego GUMed oraz Wydziału Farmaceutycznego GUMed dotyczące immunologii oraz immunopatologii. Jest opiekunem 4 prac magisterskich oraz promotorem pomocniczym w dwóch przewodach doktorskich. Brała udział i organizowała spotkania popularyzujące naukę.

## Ocena końcowa

Podumowując całą działalność naukową dr Doroty Iwaszkiewicz-Grześ chciałbym podkreślić uniwersalny charakter Jej badań. Uniwersalizm tych prac pozwala na korzystanie z tego dorobku wszystkim klinicytom, którzy tylko widzą taką potrzebę. Bardzo istotne w mojej ocenie jest, iż tematyka osiągnięcia naukowego jest spójna z tematyką prac badawczych prowadzonych przez Habilitantkę. Habilitantka doskonale orientuje się w materiale biologicznym, nad którym pracuje i potrafi poszukiwać zastosowań klinicznych dla wyników swoich badań. Świadomie używa odpowiednich linii komórkowych (często przygotowanych przez Siebie), tak aby wyniki uzyskane w doświadczeniach *in vivo*, jak najlepiej odzwierciedlały zaplanowane rezultaty. To bardzo ważna cecha dla osoby prowadzącej prace eksperymentalne w zakresie inżynierii tkankowej i świadczy o posiadaniu odpowiedniej wiedzy klinicznej i rzeczywistej znajomości całego zagadnienia, którym się zajmuje. To z kolei jest warunkiem koniecznym, aby "osiągnięcie naukowe" i cała praca badawcza Habilitantki miały aspekt uniwersalny i potencjalnie praktyczny.

Wszystkie obserwacje opisane w osiągnięciu naukowym, są bardzo interesujące a co najważniejsze mogą mieć bardzo ważne implikacje kliniczne. Bardzo wysoko oceniam wyniki przedstawionego osiągnięcia naukowego i pracy naukowej dr Doroty Iwaszkiewicz-Grześ. W mojej ocenie Habilitantka jest osobą o szerokich horyzontach naukowych a dzięki wszechstronemu i ciągle pogłębianemu wykształceniu oraz dążeniu do wyznaczonych celów rokuje Jej dalszy rozwój.

Reasumując, cała działalność dr Doroty Iwaszkiewicz-Grześ utwierdza mnie w przekonaniu, że postawa, którą prezentuje ukazują Ją jako osobę samodzielną naukowo, posiadającą zdolności do kierowania zespołami naukowymi, współpracy z innymi ośrodkami oraz organizowania środowiska do pracy dydaktycznej. W moim przekonaniu dr Dorota Iwaszkiewicz-Grześ zasługuje na nadanie Jej stopnia doktora habilitowanego.



Prof. dr hab. n. med. Tomasz Drewa, FEBU