

**Instytut Matki i Dziecka
w Warszawie**

AUTOREFERAT

Dr n. med. Marta E. Szajnik

Warszawa 11.02.2019

Spis treści

I. Dane wnioskodawcy	Str.3
II. Posiadane dyplomy i stopnie naukowe z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytuł rozprawy doktorskiej.....	Str.3
III. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych	Str.3-4
IV. Dorobek naukowy	Str.4-5
V. Cykl prac stanowiących szczególne osiągnięcie naukowy.....	Str.5-7
VI. Omówienie cyklu prac stanowiących szczególne osiągnięcie naukowe.....	Str.7-17
VII. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych, aktualnie realizowane projekty naukowo-badawcze.....	Str.17-20

I. Imię Nazwisko: **Marta Elżbieta Szajnik**

II. Posiadane dyplomy/stopnie naukowe – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej

- **2002r. – uzyskanie tytułu magistra zdrowia publicznego na Wydziale Nauk o Zdrowiu, specjalność Zarządzanie w opiece zdrowotnej, Uniwersytet Medyczny w Poznaniu.**
- **2004r. – uzyskanie tytułu lekarza medycyny, Wydział Lekarski, Uniwersytet Medyczny w Poznaniu.**
- **2007r. – uzyskanie tytułu doktora nauk medycznych, Klinika Onkologii Ginekologicznej Uniwersytet Medyczny w Poznaniu.**

Tytuł rozprawy doktorskiej: „Ocena receptorowej drogi przekazywania sygnału ludzkiej gonadotropiny kosmówkowej w komórkach raka jajnika”

Promotor w przewodzie doktorskim: prof. dr hab. Ewa Nowak- Markwitz (Klinika Onkologii Ginekologicznej Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu)

Recenzenci: prof. drab. Jan Bręborowicz (Zakład Patologii Nowotworów Wielkopolskie Centrum Onkologii w Poznaniu) oraz prof. dr hab. Antoni Basta (Klinika Ginekologii i Onkologii Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego)

- **2016r. – uzyskanie tytułu specjalisty w zakresie ginekologii i położnictwa, Państwowa Komisja Egzaminacyjna, Centrum Egzaminów Medycznych**

III. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych:

- 2004r-2005r- Szpital Wojewódzki w Poznaniu, lekarski staż podyplomowy

- 01.2006r-31.03.2007r- Klinika Onkologii Ginekologicznej, Ginekologiczno-Położniczy Szpital Kliniczny w Poznaniu, lekarz (mł. asystent)
- 03.2007r-11.2009r- Hillman Cancer Centre, University of Pittsburgh Cancer Institute, Department of Pathology, Pittsburgh, PA, USA- postdoctoral fellowship
- 11.2009r-05.2012r- Klinika Onkologii Ginekologicznej, Ginekologiczno-Położniczy Szpital Kliniczny w Poznaniu, lekarz/młodszy asystent
- 11.2009r- 10.2015r Klinika Onkologii Ginekologicznej Katedry Ginekologii, Położnictwa i Onkologii Ginekologicznej, Wydział Lekarski I Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu (dodatkowe miejsce pracy)- asystent, od 08.2011- adiunkt
- 05.2012r- 12.2017r- Klinika Ginekologii i Ginekologii Onkologicznej Wojskowy Instytut Medyczny w Warszawie, młodszy/starszy asystent
- 2014r-2016r - Zakład Immunologii Centrum Biostruktury, Warszawski Uniwersytet Medyczny, asystent naukowy
- 01.2017r- obecnie: Szpital Specjalistyczny im. Św. Rodziny w Warszawie, lekarz
- 12.2018r-obecnie: Instytut Matki i Dziecka, asystent specjalista

IV. Dorobek naukowy

Jestem autorem 27 publikacji naukowych o łącznym IF=121,345 na które składają się:

- 22 prace oryginalne
- 2 prace poglądowe
- 2 opisy przypadków
- 1 rozdział w podręczniku: Praktyczna ginekologia onkologiczna: podręcznik dla lekarzy red. Spaczyński M, Nowak-Markwitz E, Kędzia W. Poznań: Wielko. Tow.

Onkologii Ginekologicznej; Klinika Onkol. Ginek. Uniw. Med. Im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, 2012; s 18-22

Dane bibliometryczne z dnia 14.01.2019r.:

- Sumaryczny Impact Factor wszystkich prac: IF=121,345
- Index H: 20
- Liczba cytowań wg bazy Web of Science (bez autocytowań): 1838

V. Cykl prac stanowiących osiągnięcie naukowe

A. Tytuł osiągnięcia naukowego:

Mechanizmy immunosupresji i uciezki nowotworu spod kontroli układu odpornościowego zależne od limfocytów T-regulatorowych, egzosomów pochodzenia nowotworowego i receptorów Toll-podobnych w raku jajnika.

Osiągnięcie naukowe stanowi cykl 6 publikacji dotyczących badań nad wybranymi mechanizmami immunosupresji indukowanej przez raki jajnika, a także potencjalnego zastosowania uzyskanych wyników badań w praktyce klinicznej.

Łączny IF prac w cyklu: 22,624

B. Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego

1. **Szajnik M**, Czystowska M, Szczepanski MJ, Mandapathil M, Whiteside TL. Tumor-derived microvesicles induce, expand and up-regulate biological activities of human regulatory T cells (Treg). PLoS One. 2010 Jul 22;5(7):e11469

IF =4,411

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na stworzeniu koncepcji badania, wykonaniu części oznaczeń biochemicznych, analizie i opracowaniu wyników, zebraniu i interpretacji piśmiennictwa, przygotowaniu manuskryptu, komunikacji z recenzentami poprawie manuskryptu zgodnie z wymaganiami recenzentów. Mój udział procentowy szacuję na 70%

2: **Szajnik M**, Derbis M, Lach M, Patalas P, Michalak M, Drzewiecka H, Szpurek D, Nowakowski A, Spaczynski M, Baranowski W, Whiteside TL. Exosomes in Plasma of Patients with Ovarian Carcinoma: Potential Biomarkers of Tumor Progression and Response to Therapy. *Gynecol Obstet (Sunnyvale)*. 2013 Apr 29;Suppl 4:3.

IF=1,66

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na stworzeniu koncepcji badania, wykonaniu części oznaczeń biochemicznych, merytorycznej i statystycznej analizie danych, opracowaniu wyników, zebraniu piśmiennictwa, przygotowaniu manuskryptu, tabel, komunikacji z recenzentami, dokonaniu zmian i poprawek manuskryptu wymaganych przez recenzentów. Mój udział procentowy szacuję na 70%

3: Wieckowski EU, Visus C, **Szajnik M**, Szczepanski MJ, Storkus WJ, Whiteside TL. Tumor-derived microvesicles promote regulatory T cell expansion and induce apoptosis in tumor-reactive activated CD8+ T lymphocytes. *J Immunol*. 2009 Sep 15;183(6):3720-30.

IF=5,646

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na, wykonaniu części oznaczeń biochemicznych, merytorycznej i statystycznej analizie danych, opracowaniu wyników, zebraniu piśmiennictwa, przygotowaniu części manuskryptu oraz tabel. Mój udział procentowy szacuję na 30%

4. **Szajnik M**, Szczepanski MJ, Czystowska M, Elishaev E, Mandapathil M, Nowak-Markwitz E, Spaczynski M, Whiteside TL. TLR4 signaling induced by lipopolysaccharide or paclitaxel regulates tumor survival and chemoresistance in ovarian cancer. *Oncogene*. 2009 Dec 10;28(49):4353-63.

IF=7,135

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na stworzeniu koncepcji badania, wykonaniu części oznaczeń biochemicznych, merytorycznej i statystycznej analizie danych, opracowaniu

wyników, zebraniu piśmiennictwa, przygotowaniu manuskryptu, tabel, komunikacji z recenzentami, dokonaniu zmian i poprawek manuskryptu wymaganych przez recenzentów. Mój udział procentowy szacuję na 70%

5: **Szajnik M**, Czystowska-Kuźmich M, Elishaev E, Whiteside TL. Biological markers of prognosis, response to therapy and outcome in ovarian carcinoma. *Expert Rev Mol Diagn.* 2016 Aug;16(8):811-26.

IF=3,1

6. Whiteside TL, Mandapathil M, Szczepanski M, **Szajnik M**. Mechanisms of tumor escape from the immune system: adenosine-producing Treg, exosomes and tumor-associated TLRs. *Bull Cancer.* 2011 Feb;98(2):E25-31.

IF= 0,672

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na przygotowaniu i analizie danych do publikacji i napisanie części manuskryptu. Wykonane przeze mnie doświadczenia to izolacja mikropęcherzyków, ocena cytofluorymetryczna leukocytów, hodowle in vitro oraz badania immunohistochemiczne. Mój udział procentowy szacuję na 25%.

VI. Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.

Powstanie nowotworu jest procesem wieloetapowym. Istotną rolę w zapoczątkowaniu procesu chorobowego przypisuje się predyspozycji genetycznej i ekspozycji na czynniki kancerogenne. Coraz liczniejsze dowody wskazują na istnienie zależności pomiędzy rozwojem procesu nowotworowego, a funkcją układu immunologicznego. Obserwuje się zwiększone względne ryzyko powstawania nowotworów u chorych poddanych przewlekłej immunosupresji (np. u ludzi po przeszczepach allogenicznym, u chorych na AIDS) oraz spontaniczną remisję choroby u niektórych pacjentów z nowotworami. Wiele osób, u których

rozwija się nowotwór złośliwy prezentuje odpowiedź immunologiczną przeciwko komórkom nowotworowym. Aktywność immunologiczna gospodarza przejawia się obecnością swoistych limfocytów T cytotoksycznych w mikrośrodowisku guza i w krążeniu oraz produkcją przeciwciał wiążących się z antygenami nowotworowymi. Takie obserwacje jako pierwszy poczynił już w 1909 r Paul Erlich, który zasugerował, że układ immunologiczny rozpoznaje komórki nowotworowe i ma zdolność do ich eliminacji. W drugiej połowie dwudziestego wieku Lewis Thomas i McFarlane Burnet sformułowali teorię nadzoru immunologicznego (ang. *immune surveillance*), która zakłada, że komórki nowotworowe pojawiają się w organizmie znacznie częściej niż klinicznie jawny nowotwór, ale są pod stałą kontrolą układu odpornościowego, który skutecznie je rozpoznaje i eliminuje. Hipoteza ta stanowi intelektualną podstawę immunologii nowotworów i ma istotne znaczenie dla zrozumienia funkcji układu odpornościowego w przebiegu procesu nowotworowego. Odpowiedź przeciwnowotworowa obejmuje zarówno mechanizmy komórkowe jak i humoralne. Do najważniejszych mechanizmów immunologicznych uczestniczących w obronie przeciwnowotworowej należą: aktywność limfocytów T, B, makrofagów, komórek NK, komórek dendrytycznych oraz aktywność cytokin, takich jak interleukiny, interferony, chemokiny czy nadrodzina TNF.

Antygeny związane z nowotworem

Nowotwory złośliwe żeńskich narządów płciowych, podobnie jak inne nowotwory, charakteryzują się obecnością antygenów nowotworowych, których obecność uzasadnia możliwości wytworzenia swoistej odpowiedzi przeciwnowotworowej gospodarza. Dotychczas scharakteryzowano wiele takich antygenów używając do tego metod genetycznych, biochemicznych i bioinformatycznych. Większość z tych antygenów nie ma charakteru swoistego i są to najczęściej zmutowane białka własne lub białka, których ekspresja jest nadmierna w stosunku do komórek zdrowych. Antygeny związane z nowotworami powstają w wyniku kaskady biochemicznych reakcji przy udziale białek APM (ang. *antigen presenting machinery*). Antygeny nowotworowe mogą być prezentowane limfocytom T przez same komórki nowotworowe, jednak niski poziom ekspresji białek zgodności tkankowej (MHC) klasy I i/lub II sprawia, że jest to proces mało wydajny. Bardziej precyzyjne jest pobieranie antygenów nowotworowych przez komórki dendrytyczne (np. z rozpadłych komórek nowotworowych), które stanowią główną i najbardziej wyspecjalizowaną populację komórek prezentujących antygeny. Komórki dendrytyczne dzięki obecności na swojej powierzchni antygenów zgodności tkankowej klasy I i II tworzą

kompleks z antygenem nowotworowym. Tak powstały kompleks uczuła następnie limfocyty T w sposób klasyczny lub w mechanizmie prezentacji (ang. *cross-presentation*).

Immunoedycja nowotworu

Podczas progresji nowotworowej dochodzi do zjawiska selekcji klonów i powstania swoistych wariantów komórek nowotworowych. W 2004 roku Dunn i wsp. zaproponowali termin immunoedycji nowotworów (ang. *cancer immunoediting*), który określa dynamiczny i ukierunkowany w czasie charakter interakcji pomiędzy komórkami układu odpornościowego, a komórkami nowotworowymi. Pierwsza faza – eliminacji - rozpoczyna się zaraz po pojawieniu się typowych oznak nowotworzenia jak np. formowanie nowych naczyń krwionośnych (angiogeneza) czy zaburzenie komórkowej integralności tkanek. Na tym etapie układ odpornościowy uruchamia zarówno swoiste jak i nieswoiste mechanizmy obronne. Komórki nowotworowe poddawane są presji efektorowych mechanizmów immunologicznych, które prowadzą do eliminacji większości komórek nowotworowych. Jednak jeśli pojawią się kolejne mutacje w komórkach nowotworowych i nie zostaną one rozpoznane przez układ immunologiczny, dochodzi do selektywnego przeżycia i namnażania się nowych wariantów komórkowych. Powstające klony komórek nowotworowych cechują się osłabioną wrażliwością na cytotoksyczne mechanizmy efektorowe. Rozpoczyna się faza dynamicznej równowagi pomiędzy komórkami eliminowanymi przez układ odpornościowy a komórkami, w których pojawia się stan swoistej oporności na działanie układu odpornościowego. Tu następuje ciągłe „rzeźbienie” komórek które przetrwały fazę eliminacji. Nowotwór korzysta z obecności komórek zapalnych i produkuje chemokiny. Następuje rekrutacja komórek naciekających guz (tzw. *tumor infiltrating lymphocytes, TIL*) i tworzy się zrąb (stroma) nowotworu. Faza równowagi jest procesem długotrwałym i może trwać nawet kilkanaście lat. Ostatnim etapem jest faza ucieczki. Dochodzi do selektywnego przeżycia najbardziej złośliwych klonów komórek nowotworowych. Powstaje populacja komórek o obniżonej immunogenności, niewrażliwa na działanie komórek efektorowych. Następuje szybki rozrost komórek guza, które „uciekły” spod nadzoru układu immunologicznego.

Mechanizmy ucieczki nowotworów przed odpowiedzią immunologiczną

Większość nowotworów wytworzyła szereg mechanizmów pozwalających na uniknięcie odpowiedzi immunologicznej gospodarza (ang. *immune escape*). Są to m.in. obniżenie lub brak ekspresji antygenów zgodności tkankowej klasy I i II (MHC I i II); obniżenie ekspresji

lub brak sygnałów kostymulujących np. cząsteczki B7; synteza i wydzielanie czynników immunosupresyjnych (IL-10, TGFB, PGE2, VEGF); zwiększona apoptoza limfocytów T i komórek NK; produkcja i wydzielanie egzosomów; hamowanie dojrzewania komórek dendrytycznych; rekrutacja do mikrośrodowiska guza komórek o silnym potencjale immunosupresyjnym.

Najważniejszymi komórkami w zwalczaniu nowotworu są limfocyty T- cytotoksyczne CD8+ i wspomagające je limfocyty T –pomocnicze CD4+, które mają zdolność rozpoznawania antygenów związanych z guzem. Wiele danych potwierdza, że nowotwór bezpośrednio hamuje przeciwnowotworową odpowiedź komórek T używając do tego celu wielu mechanizmów. Jednym z nich jest obniżanie lub brak ekspresji antygenów zgodności tkankowej klasy I i II (MHC I i II). Aby nowotwór mógł być rozpoznany przez limfocyty T, musi on prezentować na swojej powierzchni antygeny własne w kompleksie z białkami MHC. Stwierdzono, że w komórkach nowotworowych dochodzi do nieprawidłowej wewnątrzkomórkowej obróbki antygeny w celu przygotowania go do prezentacji (obniżona ekspresja m.in. białek TAP1/TAP2, upośledzona funkcja proteasomów). W ten sposób nowotwór nie może prezentować własnych antygenów i staje się „niewidoczny” dla układu odpornościowego, a w szczególności dla limfocytów T cytotoksycznych. Nowotwór wykazuje również obniżoną ekspresję cząsteczek kostymulujących na powierzchni, co również jest niezbędne do prawidłowej aktywacji limfocytów cytotoksycznych. Hamująco na odpowiedź przeciwnowotworową mogą również wpływać wydzielanie przez komórki nowotworowe czynniki immunosupresyjne np. prostaglandyny E2 (PGE2), interleukiny 10 (IL-10), IL-6 czy transformujący czynnik wzrostu 1 β (TGF 1 β). Wytwarzany przez wiele typów komórek nowotworowych czynnik wzrostu śródbłonna naczyń – VEGF (vascular endothelial growth factor) nie tylko jest czynnikiem proangiogennym, który bierze udział w powstawaniu naczyń krwionośnych, ale także hamuje dojrzewanie komórek dendrytycznych oraz ich różnicowanie się z prekursorów. Stwierdzono również, że u chorych na nowotwory dochodzi do zwiększonej apoptozy limfocytów T i komórek NK w mechanizmie Fas-Fas L zależnym. Dodatkowo nowotwory złośliwe mają zdolność do produkcji i wydzielania do mikrośrodowiska nowotworu oraz do krążenia tzw. egzosomów (ang. *microvesicles-MV*). Są to małe, wielkości wirusa struktury, objęte błoną komórkową, które niosą na swojej powierzchni antygeny nowotworowe, białka immunosupresyjne i proapoptotyczne. Nowotwór realizuje efekt immunosupresyjny także poprzez hamowanie dojrzewania komórek dendrytycznych, które odgrywają kluczową rolę w prezentacji antygenów nowotworowych

limfocytom T. Innym opisanym mechanizmem hamującym odpowiedź przeciwnowotworową jest rekrutacja do mikrośrodowiska raka komórek immunologicznych o silnym potencjale immunosupresyjnym. Należą do nich limfocyty T regulatorowe (Treg), a także mieloidalne komórki supresyjne (tzw. *myeloid derived suppressor cells -MDSC*).

Mikrośrodowisko nowotworu- interakcje guza i komórek układu immunologicznego

Mikrośrodowisko nowotworu to ogół wszystkich warunków, w których żyją i rozwijają się komórki nowotworowe. Zbudowane jest z proliferujących komórek nowotworowych stanowiących jego miąższ oraz ze zrębu utworzonego przez tkankę łączną. W zrębie znajdują się naczynia krwionośne odżywiająca tkankę nowotworową oraz naczynia chłonne, które drenują produkty metabolizmu i rozpadu komórek nowotworowych. Dodatkowo komórki nowotworowe, rekrutują ze szpiku i z krwioobiegu komórki zapalne, które naciekają guz. Należą do nich subpopulacje komórek immunokompetentnych, jak komórki odpowiedzi wrodzonej nieswoistej (NK, makrofagi), komórki prezentujące antygen (komórki dendrytyczne, makrofagi), komórki efektorowe odpowiedzi swoistej (limfocyty T cytotoksyczne) oraz komórki regulatorowe (limfocyty T regulatorowe). Nagromadzone komórki zapalne ulegają przeprogramowaniu przez komórki nowotworowe i w dalszym etapie wspierają rozwój i progresję guza. Makrofagi związane z nowotworem (tzw. *tumor associated macrophages - TAM*) różnią się fenotypowo od makrofagów występujących w narządach prawidłowych. TAM (tzw. M2) pełnią przede wszystkim funkcje immunosupresyjne poprzez produkcję cytokin i prostaglandyn IL-10, VEGF, IL-8, TNF- α , PGE2, podczas gdy makrofagi narządów prawidłowych (tzw. M1) pełnią funkcję immunostymulującą poprzez produkcję np. IL-12. Dodatkowo TAM przy użyciu metaloproteinaz przekształcają macierz pozakomórkową i wytwarzają białka: fibrynę i kolagen. Komórki nowotworowe rekrutują ze szpiku niedojrzałe komórki dendrytyczne, które wspomagają proces angiogenezy poprzez produkcję TNF- α i osteopontyny. W mikrośrodowisku nowotworu występują też swoiste dla nowotworów fibroblasty (tzw. *cancer associated fibroblasts-CAF*), które wydzielają wiele czynników wzrostowych, a także enzymy degradujące macierz pozakomórkową, m.in. MMP2, MMP3, MMP9. Rekrutowane ze szpiku i z krwioobiegu komórki MDSC to populacja komórek, która składa się z niedojrzałych makrofagów, granulocytów, komórek dendrytycznych i innych komórek o silnym potencjale immunosupresyjnym. Pod wpływem wydzielanych przez komórki nowotworowe cytokin np. cyklooksygenaza-2 (COX-2), VEGF, IL-10, IL-6 dochodzi do aktywacji komórek MDSC, czego wynikiem jest wzmożone wydzielanie cytokin immunosupresyjnych –IL-10, TGF- β .

Komórki MDSC wytwarzają także arginazę, która prowadzi do powstania toksycznych dla limfocytów związków jak np. tyrozyna i inaktywacji białek koniecznych do proliferacji limfocytów T prowadząc do zahamowania ich czynności. Także napływające do mikrośrodowiska komórki Treg hamują proliferację limfocytów efektorowych oraz wydzielanie przez nie cytokin prozapalnych, a także działają supresyjnie w stosunku do limfocytów T CD8+, komórek NK i komórek dendrytycznych. Podsumowując mikrośrodowisko nowotworu umożliwia komórkom nowotworowym przeżycie, proliferację i stanowi osłonę przed atakiem układu odpornościowego.

W ostatnich latach ważną rolę w leczeniu nowotworów przypisuje się immunoterapii. Immunoterapia to strategia leczenia, w której wykorzystywane są naturalne mechanizmy odpowiedzi immunologicznej. Jej celem jest zwalczanie choroby resztkowej oraz kontrolowanie przerzutów nowotworowych. Podczas konferencji Amerykańskiego Towarzystwa Onkologii Klinicznej (ASCO) podkreślono, że immunoterapia zdominuje leczenie chorób nowotworowych, a po 2020 roku może być wykorzystana w leczeniu nawet co drugiego nowotworu. W 2016 roku ASCO uznało tę formę terapii za największe osiągnięcie minionego roku. W roku 2018 prof. James P. Allison z USA oraz Tasaku Honjo z Japonii otrzymali Nagrodę Nobla w dziedzinie medycyny i fizjologii za wkład w rozwój innowacyjnej metody jaką jest immunoterapia nowotworów. Do istotnych zalet immunoterapii nowotworów należy mała inwazyjność i niska szkodliwość dla chorego. Dlatego prowadzenie badań nad rolą układu odpornościowego w immunologii nowotworów jest niezwykle ważne.

Tematyka dotycząca immunologii nowotworów jest bardzo szeroka i obejmuje zarówno badania nad mechanizmami ucieczki nowotworu spod nadzoru układu immunologicznego jak i sposobami przywrócenia sprawnie działającego układu odpornościowego.

Cykl prac stanowiących osiągnięcie naukowe dotyczy wybranych mechanizmów immunosupresji indukowanych przez raka jajnika i zależnych od limfocytów T-regulatorowych, egzosomów pochodzenia nowotworowego i receptorów Toll-podobnych.

W pracy nr 1 pt.: “Tumor-derived microvesicles induce, expand and up-regulate biological activities of human regulatory T cells (Treg)” przedstawiono wyniki badań dotyczących roli MVs w hamowaniu odpowiedzi przeciwnowotworowej gospodarza. Mikropęcherzyki/egzosomy są cząsteczkami o średnicy porównywalnej do wirusów (ok. 30-

100nm). Złuszczone są zarówno przez komórki zdrowe jak i nowotworowe. Profil molekularny potwierdza obecność wielu białek, kwasów nukleinowych i innych cząstek, które znajdują się w komórkach, z których MVs pochodzą. Wyniki badań z krwi obwodowej i płynu wysiękowego z jamy brzusznej (*ascites*) pochodzące od chorych z rakiem jajników oraz z ustalonych linii nowotworowych tych raków, potwierdziły wpływ MVs na proliferację i funkcje limfocytów T regulatorowych. Otrzymane wyniki badań wskazują na nowy mechanizm ucieczki nowotworu spod kontroli układu immunologicznego i promowania rozwoju guza. W przeprowadzonych badaniach wykazano, że w warunkach hodowli *in vitro*, MVs stymulują proliferację limfocytów T regulatorowych o fenotypie CD4+CD25^{high}FoxP3⁺ i konwersję fenotypową limfocytów CD4+CD25⁻ do limfocytów T regulatorowych. Populacja uzyskanych w ten sposób limfocytów wykazywała silne właściwości supresyjne w stosunku do konwencjonalnych limfocytów CD4+CD25⁻ i limfocytów T cytotoksycznych CD3+CD8⁺. Uzyskane wyniki badań potwierdziły również, że immunosupresja wywołana przez limfocyty Treg jest zależna od wydzielanych przez Treg cytokin jak IL-10 i TGF-beta. Treg wykazywały ekspresję wielu markerów odpowiedzialnych za właściwości immunosupresyjne, takie jak GITR, CTLA-4, FasL, CCR7. Z kolei w hodowlach *in vitro* limfocytów T z mikropęcherzykami uzyskanymi z komórek dendrytycznych (grupa kontrolna) nie uzyskano limfocytów Treg o powyżej opisanych właściwościach. Wyniki badań potwierdzają również występowanie zjawiska międzykomórkowej wymiany informacji (ang. cross-talk) pomiędzy komórkami nowotworowymi, a komórkami immunologicznymi co ma istotny wpływ na regulowanie odpowiedzi przeciwnowotworowej gospodarza.

W pracy nr 2 pt: „Exosomes in Plasma of Patients with Ovarian Carcinoma: Potential Biomarkers of Tumor Progression and Response to Therapy” badano związek pomiędzy obecnością białka w osoczu pacjentów z rakiem jajnika a wynikami leczenia, reakcją na standardową terapię i / lub opornością na leczenie nowotworów u pacjentów z pierwotnym rakiem jajnika oraz podczas kolejnych kursów chemioterapii i po zakończonej terapii. W tym celu wyizolowano egzosomy z osocza: pacjentów z rakiem jajnika; pacjentów z guzami łagodnymi oraz od zdrowych dawców. Egzosomy wizualizowano za pomocą skaningowej mikroskopii elektronowej. Mierzono zawartość białka. Obecność MAGE 3/6 i TGF-β1 w egzosomach oceniano w analizach Western blot.

Wykazano, że osocza pacjentów z rakiem jajnika zawierały wyższe poziomy białka egzosomalnego w porównaniu z tymi wyizolowanymi z osocza pacjentów z łagodnymi

guzami lub NC. Egzosomy wyizolowane z osocza pacjentów z rakiem jajnika zawierały TGF- β 1 i MAGE3 / 6, które odróżniały pacjentów z rakiem jajnika od pacjentów z łagodnymi guzami i NC. Wysoki poziom białka egzosomów obserwowano u nowo zdiagnozowanych pacjentów; jednak w zaawansowanych stadiach pacjentów z rakiem jajnika zawartość białka w izolowanych egzosomach była znacznie wyższa niż we wczesnych stadiach. Zmieniające się poziomy egzosomów podczas i po chemioterapii oraz korelacje między poziomem białka eksosomalnego a danymi klinicznymi sugerowały, że zawartość białka w egzosomach może być użyteczna w przewidywaniu odpowiedzi na leczenie i rokowaniu u pacjentów z rakiem jajnika. Analiza poziomów egzosomów osocza oferuje nowe podejście do diagnozy i monitorowania odpowiedzi na terapię u pacjentów z rakiem jajnika.

W pracy nr 3 pt: „Tumor-derived microvesicles promote regulatory T cell expansion and induce apoptosis in tumor-reactive activated CD8+ T lymphocytes” wykazano, że surowice pacjentów z nowotorem złośliwym zawierają egzosomy pochodzenia nowotworowego zdolne do indukowania apoptozy aktywowanych komórek T przez aktywację szlaku ligandu Fas / Fas. Jednakże komórkowe pochodzenie MV występujących w surowicach pacjentów z rakiem różni się tak samo jak ich profile molekularne i komórkowe. Aby odróżnić MV pochodzące z surowic chorych i zdrowych użyto markera MAGE 3/6 (+) obecnego w guzach nowotworowych i MV pochodzenia nowotworowego. Stwierdzono, że profile te różnią się dla każdego typu komórek. Jedynie MV pochodzenia nowotworowego wykazywały ekspresję MAGE 3/6 (+) i były zmiennie wzbogacone w ligand 42-kDa Fas i MHC klasy I, ale nie w klasie II. Oceniano również wpływ MV na przekazywanie sygnałów przez TCR i IL-2R oraz proliferację lub apoptozę aktywowanych pierwotnych komórek T i subpopulacji komórek T. Badania funkcyjne wykazały, że MV pochodzenia nowotworowego hamowały przekazywanie sygnału i proliferację aktywowanych limfocytów T CD8 (+), ale nie CD4 (+). Ponadto hamowały indukowaną apoptozę limfocytów T CD8 (+), w tym reaktywne wobec nowotworu komórki T tetramer (+) CD8 (+). MV pochodzenia nowotworowego, ale nie z komórek dendrytycznych indukowały ekspansję *in vitro* komórek regulatorowych CD4 (+) CD25 (+) FOXP3 (+) T i zwiększały ich aktywność supresorową. Dane sugerują, że MV pochodzenia nowotworowego indukują immunosupresję przez promowanie ekspansji komórek regulatorowych T i zanik komórek T CD8 (+) przeciwnowotworowych, przyczyniając się w ten sposób do ucieczki guza spod nadzoru układu immunologicznego.

W pracy numer 4 pt: „TLR4 signaling induced by lipopolysaccharide or paclitaxel regulates tumor survival and chemoresistance in ovarian cancer” badano wybrane receptory Toll-podobne (TLR). TLR ulegają ekspresji na komórkach odpornościowych i wywołują reakcje zapalne. TLR ulegają także ekspresji w komórkach raka jajnika i raków głowy i szyi, ale ich rola i przekazywanie sygnału przez szlak TLR4 / MyD88 w tych komórkach nie są jasne. W pracy oceniono ekspresję TLR4 i MyD88 w tkankach raka jajnika i w liniach komórkowych raka jajnika za pomocą PCR z odwrotną transkryptazą, western blot i immunohistochemii. Proliferację komórek, apoptozę, przekazywanie sygnału przez szlak NF-kappaB, ekspresję IRAK4 i TRIF i fosforylację cJun mierzono po ekspozycji komórek nowotworowych na ligandy TLR4, lipopolisacharyd (LPS) lub paklitaksel (PTX). W supernatantach z hodowli komórkowych oceniono poziom cytokin. TLR4 ulegał ekspresji w komórkach nowotworu, w niach komórek nowotworowych i prawidłowym nabłonku. MyD88 był wykrywalny w tkankach nowotworowych i w 3/5 liniach komórkowych oraz w prawidłowych komórkach. W komórkach SCOV3 MyD88 (+), wiązanie LPS lub PTX z indukowaną przez TLR4 aktywacją IRAK4 i fosforylacją cJun, aktywowało szlak NF-kappa B, produkcję interleukiny IL -8, IL-6, VEGF i MCP-1 i odporność komórek na apoptozę indukowaną lekami. Wyciszenie TLR4 w komórkach SCOV3 za pomocą siRNA skutkowało obniżeniem poziomu fosforylowanego cJun (p-cJun) i utratą oporności na PTX. W przypadku komórek wrażliwych na PTX, MyD88 (neg) A2780, stymulacja TLR4 zwiększała ekspresją TRIF, a wyciszenie TLR4 eliminowało ten efekt. Zatem sygnalizacja TLR4 / MyD88 aktywuje progresję komórek raka jajnika i chemioporność, promując tym samym ucieczkę nowotworu spod nadzoru immunologicznego

W poglądowej pracy nr 5 pt: „Biological markers of prognosis, response to therapy and outcome in ovarian carcinoma” opisano znane i potencjalne biomarkery mające zastosowanie w rokowaniu i przewidywaniu odpowiedzi na terapię. Te potencjalnie obiecujące biomarkery obejmują komórki odpornościowe i ich produkty, egzosomy pochodzenia nowotworowego, kwasy nukleinowe i biomarkery epigenetyczne. Chociaż większość dostępnych obecnie biomarkerów wymaga prospektywnej walidacji, opracowanie nieinwazyjnego monitoringu opartego na biopsji płynnej powinno poprawić ich przydatność do oceny rokowania, odpowiedzi na terapię i wyników leczenia w raku jajnika.

W pracy nr 6 pt: „Mechanisms of tumor escape from the immune system: adenosine-producing Treg, exosomes and tumor-associated TLRs” opisano wybrane mechanizmy immunosupresji indukowanej przez nowotwory. Praca opisuje prowadzone przez nasz zespół

badania w zakresie immunologii nowotworów litych takich jak raki jajnika, raki głowy i szyi a także w ostrych białaczkach szpikowych.

Pierwszym mechanizmem opisanym w publikacji jest immunosupresyjne działanie dwóch subpopulacji limfocytów T regulatorowych: nTreg i adopcyjnych Tr1, których zwiększony odsetek i immunosupresyjna funkcja stwierdzana jest w guzie nowotworowym i krwi obwodowej. Nowym zagadnieniem opisanym w pracy jest immunosupresyjne działanie adenozyiny produkowanej przez limfocyty T regulatorowe co ułatwia progresję guza. We wcześniejszych badaniach dotyczących raków głowy i szyi, wykazano, że dwie subpopulacje limfocytów T regulatorowych (nTreg i Tr1) wykazują ekspresję ektonukleotydowych (CD39 i CD73) biorących udział w hydrolizie ATP (adenozyino-5'-trifosforan) do AMP (adenozyino-5'-monofosforan) i AMP do adenozyiny. Uzyskane wyniki badań dotyczące adenozyiny w mikrośrodowisku guza mogą stanowić przesłankę do dalszych badań nad skutecznością immunoterapii nowotworów.

Drugim mechanizmem opisanym w pracy jest immunosupresyjna rola MV i ich potencjalne zastosowanie w immunoterapii. MV zawierają szereg immunosupresyjnych białek np. TGF-beta, IL-10, Fas-L przez co hamują przeciwnowotworową odpowiedź limfocytów T cytotoksycznych i komórek NK, a także indukują powstawanie i aktywują immunosupresyjne limfocyty T regulatorowe. Z drugiej jednak strony MVs posiadają właściwości immunogenne, ponieważ przenoszą antygeny pochodzenia nowotworowego i mogą być użyte do aktywacji limfocytów T efektorowych i immunoterapii. Dlatego w ostatnich latach bardzo prowadzone są bardzo intensywne badania nad wpływem MV na układ odpornościowy. W pracy przedstawiono także wyniki badań prowadzone przez nasz zespół, dotyczące wpływu MVs izolowanych z hodowlanych linii nowotworowych na proliferację, zmianę fenotypu i zwiększoną funkcję immunosupresyjną limfocytów T regulatorowych.

Trzecim opisanym mechanizmem ucieczki nowotworu spod kontroli układu immunologicznego jest występowanie przewlekłego stanu zapalnego w mikrośrodowisku guza. Badania przedstawione w publikacji prowadzone były na modelu *in vitro* na liniach hodowlanych i modelu *ex vivo* na tkankach nowotworowych pobranych od chorych z rakiem jajnika i rakami głowy i szyi. Komórki nowotworowe wykazują ekspresję receptorów odporności wrodzonej takich jak receptory toll-podobne (ang. toll-like receptors; TLRs). Aktywacja TLR4 na komórkach nowotworowych przy użyciu LPS, wzmagala proliferację komórek nowotworowych, wzmagala produkcję cytokin prozapalnych przez komórki nowotworowe, aktywowała prozapalny i antyapoptotyczny czynnik transkrypcyjny NF-

kappaB, a także hamowała apoptozę komórek nowotworowych i znacznie obniżała ich wrażliwości na chemioterapeutyki takie jak paclitaxel i cisplatyna. Ekspresja badanych TLRs została również stwierdzona na tkankach nowotworowych pobranych od chorych w trakcie leczenia chirurgicznego. Na podstawie uzyskanych danych wysunięto hipotezę, że TLR mogą pełnić podwójną rolę. Z jednej strony stanowią pierwszą linię obrony przed patogenami i odgrywają kluczową rolę w prezentacji antygenów limfocytom T, z drugiej jednak strony mogą promować rozwój guza i nasilać przewlekły stan zapalny.

VII. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych i aktualnie realizowane projekty

Pozostałe prace badawcze dotyczą głównie immunobiologii nowotworów jajnika i innych ludzkich nowotworów litych lub białaczek, których progresja związana jest z przewlekłym stanem zapalnym i immunosupresją lub z czynnością hormonalną. Prace te w większości łączą wyniki badań podstawowych z medycyną kliniczną (medycyna translacyjna). Prace obejmują również opisy przypadków klinicznych i rozdział w podręczniku dotyczący immunologii nowotworów jajnika.

1. Wen Y, Zand B, Ozpolat B, Szczepanski MJ, Lu C, Yuca E, Carroll AR, Alpay N, Bartholomeusz C, Tekedereli I, Kang Y, Rupaimoole R, Pecot CV, Dalton HJ, Hernandez A, Lokshin A, Lutgendorf SK, Liu J, Hittelman WN, Chen WY, Lopez-Berestein G, **Szajnik M**, Ueno NT, Coleman RL, Sood AK. Antagonism of tumoral prolactin receptor promotes autophagy-related cell death. *Cell Rep.* 2014 Apr 24;7(2):488-500.

2. **Szajnik M**, Szczepanski MJ, Elishaev E, Visus C, Lenzner D, Zabel M, Glura M, DeLeo AB, Whiteside TL. 17 β Hydroxysteroid dehydrogenase type 12 (HSD17B12) is a marker of poor prognosis in ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol.* 2012Dec;127(3):587-94.

3. Rahma OE, Ashtar E, Czystowska M, **Szajnik ME**, Wieckowski E, Bernstein S, Herrin VE, Shams MA, Steinberg SM, Merino M, Gooding W, Visus C, Deleo AB, Wolf JK, Bell JG, Berzofsky JA, Whiteside TL, Khleif SN. A gynecologic oncology group phase II trial of two p53 peptide vaccine approaches: subcutaneous injection and intravenous pulsed dendritic

cells in high recurrence risk ovarian cancer patients. *Cancer Immunol Immunother.* 2012 Mar;61(3):373-84.

4. Szczepanski MJ, **Szajnik M**, Welsh A, Whiteside TL, Boyiadzis M. Blast-derived microvesicles in sera from patients with acute myeloid leukemia suppress natural killer cell function via membrane-associated transforming growth factor-beta1. *Haematologica.* 2011 Sep;96(9):1302-9.

5. Czystowska M, Szczepanski MJ, **Szajnik M**, Quadrini K, Brandwein H, Hadden JW, Whiteside TL. Mechanisms of T-cell protection from death by IRX-2: a new immunotherapeutic. *Cancer Immunol Immunother.* 2011 Apr;60(4):495-506.

6. Nowak-Markwitz E, Puła B, **Szajnik M**, Dziegiel P, Piotrowska A, Zabel M, Spaczyński M. [Expression of survivin, SDF-1 and CXCR4 on tumor cells in ovarian cancer]. *Ginekol Pol.* 2010 Sep;81(9):674-7. Polish.

7. Mandapathil M, Szczepanski MJ, **Szajnik M**, Ren J, Jackson EK, Johnson JT, Gorelik E, Lang S, Whiteside TL. Adenosine and prostaglandin E2 cooperate in the suppression of immune responses mediated by adaptive regulatory T cells. *J Biol Chem.* 2010 Sep 3;285(36):27571-80.

8. Macatangay BJ, **Szajnik ME**, Whiteside TL, Riddler SA, Rinaldo CR. Regulatory T cell suppression of Gag-specific CD8 T cell polyfunctional response after therapeutic vaccination of HIV-1-infected patients on ART. *PLoS One.* 2010 Mar 24;5(3):e9852.

9. Czystowska M, Strauss L, Bergmann C, **Szajnik M**, Rabinowich H, Whiteside TL. Reciprocal granzyme/perforin-mediated death of human regulatory and responder T cells is regulated by interleukin-2 (IL-2). *J Mol Med (Berl).* 2010 Jun;88(6):577-88.

10. Mandapathil M, Hilldorfer B, Szczepanski MJ, Czystowska M, **Szajnik M**, Ren J, Lang S, Jackson EK, Gorelik E, Whiteside TL. Generation and accumulation of immunosuppressive adenosine by human CD4⁺CD25^{high}FOXP3⁺ regulatory T cells. *J Biol Chem.* 2010 Mar 5;285(10):7176-86.

11. Mandapathil M, Szczepanski MJ, **Szajnik M**, Ren J, Lenzner DE, Jackson EK, Gorelik E, Lang S, Johnson JT, Whiteside TL. Increased ectonucleotidase expression and activity in regulatory T cells of patients with head and neck cancer. *Clin Cancer Res*. 2009 Oct 15;15(20):6348-57.
12. Strauss L, Czystowska M, **Szajnik M**, Mandapathil M, Whiteside TL. Differential responses of human regulatory T cells (Treg) and effector T cells to rapamycin. *PLoS One*. 2009 Jun 22;4(6):e5994.
13. Szczepanski MJ, **Szajnik M**, Welsh A, Foon KA, Whiteside TL, Boyiadzis M. Interleukin-15 enhances natural killer cell cytotoxicity in patients with acute myeloid leukemia by upregulating the activating NK cell receptors. *Cancer Immunol Immunother*. 2010 Jan;59(1):73-9.
14. Levina VV, Nolen B, Su Y, Godwin AK, Fishman D, Liu J, Mor G, Maxwell LG, Herberman RB, Szczepanski MJ, **Szajnik ME**, Gorelik E, Lokshin AE. Biological significance of prolactin in gynecologic cancers. *Cancer Res*. 2009 Jun 15;69(12):5226-33.
15. Szczepanski MJ, **Szajnik M**, Czystowska M, Mandapathil M, Strauss L, Welsh A, Foon KA, Whiteside TL, Boyiadzis M. Increased frequency and suppression by regulatory T cells in patients with acute myelogenous leukemia. *Clin Cancer Res*. 2009 May 15;15(10):3325-32.
16. **Szajnik M**, Szczepanski MJ, Czystowska M, Elishaev E, Mandapathil M, Nowak-Markwitz E, Spaczynski M, Whiteside TL. TLR4 signaling induced by lipopolysaccharide or paclitaxel regulates tumor survival and chemoresistance in ovarian cancer. *Oncogene*. 2009 Dec 10;28(49):4353-63.
17. Levina V, Nolen BM, Marrangoni AM, Cheng P, Marks JR, Szczepanski MJ, **Szajnik ME**, Gorelik E, Lokshin AE. Role of eotaxin-1 signaling in ovarian cancer. *Clin Cancer Res*. 2009 Apr 15;15(8):2647-56.
18. Szczepanski MJ, Czystowska M, **Szajnik M**, Harasymczuk M, Boyiadzis M, Kruk-Zagajewska A, Szyfter W, Zeromski J, Whiteside TL. Triggering of Toll-like receptor 4

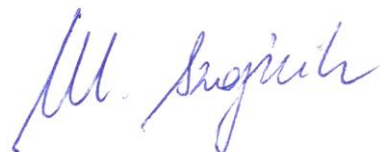
expressed on human head and neck squamous cell carcinoma promotes tumor development and protects the tumor from immune attack. Cancer Res. 2009 Apr 1;69(7):3105-13.

19. **Marta Szajnik**, Ewa Nowak-Markwitz, Mirosław Szczepanski, Marek Spaczyński, Krzysztof Linke, Jan Żeromski. The diagnostic problems in patient with ascites, elevated Ca 125 level and autoantibodies against nuclear antigens and smooth muscle antigens mimicking advanced ovarian carcinoma--case study. Ginekol Pol. 2008 May;79(5):375-7.

20. **Szajnik M**, Nowak-Markwitz E, Szczepański MJ, Spaczyński M. [Assessment of expression of luteinizing hormone (LH)/human chorionic gonadotropin (hCG) receptor (LH/hCGR) and hCG protein in ovarian cancer tissues]. Ginekol Pol. 2007 Dec;78(12):939-43. Polish.

21. Nowakowski A(1), Kozłowski W, Włodarczyk D, **Szajnik M**, Baranowski W. A case of a large solitary fibrous tumour of the uterine cervix. BMC Womens Health. 2014 Jan 7;14:3.

Rozdział w podręczniku: Praktyczna ginekologia onkologiczna:podręcznik dla lekarzy red. Spaczyński M, Nowak-Markwitz E, Kędzia W. Poznań: Wielko. Tow. Onkologii Ginekologicznej;Klinika Onkol. Ginek. Uniw. Med. Im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, 2012; s 18-22



Warszawa dn. 11.02.2019r.

MARTA E. SZAJNIK