



Prof. dr hab. n. med. Izabela Zawlik
Kierownik Zakładu Genetyki Ogólnej
Instytut Nauk Medycznych
Kierownik Laboratorium Biologii Molekularnej
Przyrodniczo–Medyczne Centrum Badań Innowacyjnych
Kolegium Nauk Medycznych
Uniwersytet Rzeszowski

Rzeszów, 23.05.2022

Recenzja rozprawy doktorskiej magister Aleksandry Kubiak pt.: „Wpływ wenetoklaksu (WEN) i kladrybiny (2-CdA) na apoptozę komórek przewlekłej białaczki limfocytowej w badaniach *in vitro*”

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pani magister Aleksandry Kubiak pt.: „Wpływ wenetoklaksu (WEN) i kladrybiny (2-CdA) na apoptozę komórek przewlekłej białaczki limfocytowej w badaniach *in vitro*” została przygotowana pod kierunkiem Pani prof. dr hab. n. med. Anny Koryckiej-Wołowiec oraz Pani dr n. med. Eweliny Ziółkowskiej pełniącej rolę promotora pomocniczego. Praca doktorska została przygotowana w Katedrze i Klinice Hematologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi. Praca doktorska dotyczy oceny cytotoksycznego wpływu wenetoklaksu w połączeniu z kladrybiną na limfocyty białaczkowe izolowane od nieleczonych chorych na przewlekłą białaczkę limfocytową oraz oceny wpływu badanych leków zastosowanych w skojarzeniu na apoptozę komórek białaczkowych. W pracy dokonano również oceny wpływu badanych leków zastosowanych pojedynczo i w skojarzeniu na ekspresję kilkunastu białek i genów uczestniczących w apoptozie. Temat podjęty w pracy doktorskiej jest bardzo ważny dla opracowania nowych kombinacji terapeutycznych w PBL.

Praca doktorska została wydana w formie oprawionego maszynopisu liczącego 133 strony. Praca ma typowy układ stosowany w rozprawach doktorskich z podziałem na rozdziały: wstęp, założenia i cel pracy, materiał i metody, wyniki, dyskusja, obserwacje, wnioski, streszczenie (w języku polskim i angielskim), piśmiennictwo oraz spis tabel i rycin. Praca zawiera wykaz skrótów, 13 tabel oraz 30 wykresów. Piśmiennictwo obejmuje 165 pozycji literaturowych pochodzące głównie z ostatnich kilku lat. Rozprawa doktorska napisana jest w zwartym i syntetycznym stylu. Wstęp pracy stanowi dokładną analizę aktualnego stanu wiedzy na temat podjętego problemu badawczego uzasadniając celowość prowadzonych badań. Wstęp pracy jest podzielony na pięć podrozdziałów. W pierwszym podrozdziale przedstawiono szczegółowy opis dotyczący epidemiologii, kryteriów rozpoznania i klasyfikacji przewlekłej białaczki limfocytowej. W drugim podrozdziale Wstępu przedstawiono szczegółowy opis czynników prognostycznych PBL. W trzecim podrozdziale Wstępu przedstawiono dokładny opis procesu apoptozy komórek białaczkowych. W czwartym podrozdziale przedstawiono opis dotyczący leczenia PBL. W piątym podrozdziale Wstępu przedstawiono opis dotyczący znaczenia badań *in vitro*.

Założenia i cele podjętych badań zostały jasno sformułowane. Cele szczegółowe pracy zostały precyzyjnie przedstawione w czterech punktach i poprawność ich sformułowania nie budzi wątpliwości. Wszystkie etapy badawcze zostały prawidłowo zaprojektowane i zrealizowane. Grupę badaną stanowiło 103 dotychczas nieleczonych chorych na PBL. Analizę ekspresji wybranych białek i genów uczestniczących w procesie apoptozy przeprowadzono u 40 chorych spośród 103 chorych włączonych do badania. Jedyne zastrzeżenie budzi w tym miejscu brak wyjaśnienia na jakiej podstawie wybrano 40 chorych do analiz ekspresji białek i genów spośród 103 chorych stanowiących całkowitą grupę badaną oraz brak podania jaki jest dokładnie średni wiek i zakres wiekowy wybranych 40 chorych u których przeprowadzono analizę ekspresji białek i genów. Ponadto w pracy warto byłoby wykonać analizę mutacji genu *IGVH*. Statusu mutacyjny genu *IGVH* ma istotne znaczenie prognostyczne w PBL i może wpływać na ekspresję białek i genów uczestniczących w apoptozie dlatego zalecane jest wykonanie tego badania i uzupełnienie danych na etapie przygotowywania publikacji. Dodatkowo dla 17

pacjentów z 40 nie było dostępnych informacji o aberracjach cytogenetycznych istotnych w przebiegu PBL.

Zastosowane w pracy metody badawcze zostały szczegółowo opisane. Do oceny żywotności komórek przed założeniem hodowli oraz oceny cytotoksyczności badanych leków po hodowli wykorzystano test z jodkiem propydyiny. Apoptozę komórek białaczkowych oceniano przy użyciu aneksyny-V związanej chemicznie z tioizocyjanianem fluoresceiny oraz jodku propydyiny. Ocenę ekspresji aktywnych form kaspazy: -3, -8 i -9 wykonywano metodą cytometrii przepływowej w materiale hodowlanym po 48-godzinnej inkubacji. Ocenę spadku potencjału transbłonowego mitochondriów w jednojądrowych komórkach krwi obwodowej dokonywano przed założeniem hodowli oraz po 48-godzinnej hodowli z lekami zastosowanymi pojedynczo i w skojarzeniu. Oceny cytotoksyczności dokonano w hodowli 24-godzinnej i 48-godzinnej, natomiast oceny ekspresji białek i genów uczestniczących w apoptozie dokonano w hodowli prowadzonej przez 48 godzin bez dodatku leków oraz z lekami zastosowanymi pojedynczo i w skojarzeniu. Ocenę ekspresji wybranych białek uczestniczących w apoptozie dokonano metodą cytometrii przepływowej. Ocena ekspresji wybranych genów uczestniczących w apoptozie została przeprowadzona metodą NanoString. Zastosowane metody analizy statystycznej są adekwatne dla rozwiązania problemów badawczych.

Uzyskane wyniki zostały zaprezentowane w uporządkowany sposób, a właściwie dobrane tabele i ryciny ułatwiają analizę wyników. Do najważniejszych uzyskanych wyników należy wykazanie, że WEN zastosowany zarówno pojedynczo, jak i w skojarzeniu z 2-CdA istotnie zmniejszał odsetek komórek wykazujących ekspresję białka BCL-2, a wskaźnik BCL-2/BAX był istotnie wyższy w komórkach PBL bez dodania leków niż w hodowlach po zastosowaniu WEN i/lub 2-CdA. Ponadto wykazano, że WEN powodował istotne zwiększenie ekspresji 7 genów (*APAF1*, *BBC3*, *BID*, *BIK*, *FADD*, *NOTCH1*, *SMAD3*) i zmniejszenie ekspresji 2 genów (*BCL-2* i *PMAIP*) w porównaniu z materiałem kontrolnym przed hodowlą oraz istotne zwiększenie ekspresji wszystkich badanych genów (poza *PMAIP* i nieistotnym wzrostem ekspresji *BCL-2*) w porównaniu z materiałem kontrolnym po hodowli. Wykazano także, że skojarzenie WEN z 2-CdA znamienne zwiększało ekspresję aż 13 genów (*APAF1*, *BAX*, *BBC3*, *BID*, *BIK*, *BIM*, *CASP3*, *CASP8*, *CASP9*, *FADD*,

NOTCH1, P53, SMAD3) i znamienne zmniejszała ekspresję *PMAIP* w porównaniu z materiałem kontrolnym przed hodowlą oraz zwiększała ekspresję wszystkich genów z wyjątkiem *PMAIP* i *SMAD3* w porównaniu z materiałem kontrolnym po hodowli.

Dyskusja jest napisana w sposób rzeczowy, wnikliwy i krytyczny. Wyniki uzyskane w ramach realizacji pracy doktorskiej zostały skonfrontowane z najnowszymi wynikami opublikowanych badań o podobnej tematyce. Dyskusja w pełni ukazuje bardzo dobre zorientowanie mgr Aleksandry Kubiak w aktualnej literaturze dotyczącej podjętego tematu. W Dyskusji wskazano również ograniczenia zastosowanych metod badawczych oraz kierunki dalszych badań w tej tematyce, co świadczy o dobrym przygotowaniu merytorycznym i dojrzałości naukowej Doktorantki. Na szczególną uwagę zasługuje rozdział „Obserwacje”, w którym podsumowano uzyskane wyniki. Wnioski zostały prawidłowo sformułowane w oparciu o omówione wyniki i nie budzą żadnych zastrzeżeń.

Podsumowując, wysoko oceniam wartość naukową przedstawionej pracy doktorskiej, a uwagi przedstawione w recenzji nie umniejszają mojej wysokiej oceny tej pracy. Niniejsza praca doktorska wskazuje na bardzo dobre przygotowanie teoretyczne Autorki oraz opanowanie przez nią warsztatu badawczego i umiejętności krytycznej analizy uzyskanych wyników. Przedstawiona do oceny praca doktorska pt.: „Wpływ wenetoklaksu (WEN) i kladrybiny (2-CdA) na apoptozę komórek przewlekłej białaczki limfocytowej w badaniach *in vitro*” w pełni spełnia wszystkie wymagania stawiane rozprawom doktorskim dlatego wnoszę o dopuszczenie Pani mgr Aleksandry Kubiak do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie, z uwagi na wysoką wartość poznawczą prowadzonych badań pragnę przedłożyć wniosek o wyróżnienie niniejszej pracy doktorskiej.



Prof. dr hab. n. med. Izabela Zawlik