

**Prof. dr hab. n. med. Jacek Roliński**  
**KATEDRA I ZAKŁAD IMMUNOLOGII KLINICZNEJ**  
**UNIwersYTET MEDYCZNY W LUBLINIE**

ul. Chodźki 4a  
20-093 Lublin

Tel. (0-81) 448 64 20

fax (0-81) 448 64 21

e-mail: [jacek.rolinski@gmail.com](mailto:jacek.rolinski@gmail.com)

---

Lublin dn. 23.05.2022r.

**Ocena**

**rozprawy doktorskiej magister Aleksandry Kubiak zatytułowanej: „Wpływ wenetoklaksu (WEN) i kladrybiny (2-CdA) na apoptozę komórek przewlekłej białaczki limfocytowej w badaniach in vitro” wykonanej w Katedrze i Klinice Hematologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi**

**Promotorem pracy jest Prof. dr hab. n. med. Anna Korycka-Wołowicz**

**Promotorem pomocniczym: dr n. med. Ewelina Ziółkowska**

Pomimo znacznego postępu jaki dokonał się w ostatnich latach w diagnostyce i leczeniu przewlekłej białaczki limfocytowej (PBL), żadna z dotychczas dostępnych terapii, oprócz allogenicznego przeszczepiania komórek krwiotwórczych, nie pozwala uzyskać całkowitego wyleczenia choroby. Poza stosowaną od wielu lat standardową immunochemioterapią wg schematu zawierającego rytuksymab, cyklofosfamid i analog nukleozydów purynowych - fludarabinę lub kladrybinę (2-CdA), znaczną skuteczność terapeutyczną wykazują leki celowane, w tym wenetoklaks - inhibitor antyapoptotycznego białka BCL-2. Lek ten jest przeznaczony do stosowania w monoterapii odpornej i nawrotowej PBL, u chorych z del17p/mutacją *TP53*, a także po niepowodzeniu leczenia ibrutynibem. W połączeniu z rytuksymabem lub obinutuzumabem wenetoklaks może być stosowany w PBL zarówno w pierwszej linii leczenia, jak i u chorych opornych/nawrotowych.

Rola zahamowania procesu apoptozy limfocytów białaczkowych w patogenezie PBL jest dobrze poznana, jednakże zaburzenia różnych szlaków przekazywania sygnału w komórkach nowotworowych, w tym wpływ zaburzeń ekspresji białek uczestniczących w apoptozie, jak i kodujących je genów na kształtowanie obrazu klinicznego choroby wciąż jest przedmiotem badań. Ustalenie związku pomiędzy apoptozą komórek białaczkowych, a agresywnością przebiegu klinicznego białaczki są utrudnione z uwagi na rozbieżność

pomiędzy wydłużeniem czasu przeżycia limfocytów PBL *in vivo*, a ich skłonnością do ulegania szybkiej spontanicznej apoptozie *in vitro*. Dotychczas nie badano skojarzonego działania wenetoklaksu z analogami nukleozydów purynowych, w tym 2-CdA u chorych na PBL. Wiadomo jednak, że zarówno WEN jak i 2-CdA indukują procesy apoptozy poprzez aktywację alternatywnych szlaków sygnałowych. Skuteczność takiego skojarzenia badano u chorych na ostrą białaczkę szpikową, ostrą białaczką o mieszanym fenotypie oraz w zespołach mielodysplastycznych, wykazując korzystny profil bezpieczeństwa, wysoki odsetek uzyskiwanych remisji oraz znaczącą eradykację minimalnej choroby resztkowej. Do najistotniejszych działań niepożądanych należała mielotoksyczność. Wydaję się więc, że podjęcie przez Doktorantkę badań dotyczących wpływu skojarzonego działania wenetoklaksu i 2-CdA na ekspresję białek i genów regulujących apoptozę w komórkach PBL jest w pełni uzasadnione.

Przedłożona mi do oceny rozprawa doktorska mgr Aleksandry Kubiak p.t. „Wpływ wenetoklaksu (WEN) i kladrybiny (2-CdA) na apoptozę komórek przewlekłej białaczki limfocytowej w badaniach *in vitro*” zawiera 132 strony i ma typowy dla rozpraw doktorskich układ, składając się z wykazu najczęściej używanych skrótów, spisu treści oraz rozdziałów zatytułowanych: Wstęp, Założenia i cel pracy, Materiał i metody, Wyniki, Dyskusja, Obserwacje, Wnioski, Streszczenie w języku polskim i angielskim, Piśmiennictwo. Na końcu Doktorantka umieściła Spis tabel i rycin.

W rozdziale p.t. „Wstęp” Doktorantka wnikliwie omawia zagadnienia dotyczące PBL, a więc epidemiologię, kryteria rozpoznania, charakterystykę morfologiczną i fenotypową oraz obraz kliniczny. Zwraca też uwagę na konieczność objęcia chorych na PBL szczególną opieką medyczną w dobie pandemii wirusa SARS-Cov-2. W kolejnym podrozdziale Doktorantka omawia czynniki prognostyczne w PBL, a wśród nich aberracje cytogenetyczne, mutacje genów oraz stan mutacyjny *IGVH*. W podrozdziale zatytułowanym „Apoptoza komórek białaczkowych” Doktorantka opisuje zjawisko apoptozy, charakteryzując szlaki wewnątrz- i zewnątrzpochodny oraz białka i geny uczestniczące w tym procesie. Ostatni podrozdział poświęcony jest leczeniu PBL, w którym Doktorantka szczegółowo omawia poszczególne grupy leków, zwracając szczególną uwagę na wenetoklaks i kladrybinę. Cały omawiany rozdział napisany jest jasnym i zrozumiałym językiem i świadczy, że Doktorantka posiada dobrą znajomość zarówno biologii, jak i kliniki PBL, jak również skomplikowanych mechanizmów wewnątrzkomórkowych leżących u podstaw zjawiska apoptozy. Doktorantka wykazała się umiejętnością krytycznego korzystania z piśmiennictwa naukowego i rozległą, wystarczającą do podjęcia ambitnie zakreślonych badań wiedzą na temat regulacji przeżycia

komórek omawianej białaczki. Rozdział ilustrowany jest kilkoma przejrzystymi rycinami i tabelami.

Rozdział „Założenia i cel pracy” otwiera krótkie, syntetyczne wprowadzenie teoretyczne, w sposób logiczny i przekonujący uzasadniające wybór tematu badań. Cel pracy został sformułowany w sposób opisowy jako ocena rodzaju interakcji zachodzących między badanymi lekami, jak również ocena wpływu tych leków zastosowanych w skojarzeniu na ekspresję białek i genów zaangażowanych w apoptozę komórek białaczkowych, natomiast cele szczegółowe przedstawiono w czterech nie budzących zastrzeżeń punktach. Zakreślone cele są nowatorskie oraz bardzo istotne z punktu widzenia poznawczego, a potencjalnie także klinicznego.

Rozdział „Materiał i metody” otwiera charakterystyka chorych. Efekt cytotoksyczny badanych leków oraz rodzaj interakcji zachodzącej pomiędzy nimi Doktorantka oceniała *in vitro* w limfocytach krwi obwodowej pobranych od 103 nieleczonych chorych na PBL. U 40 spośród nich zbadała ponadto ekspresję białek i genów uczestniczących w regulacji apoptozy. Charakterystyka fenotypowa limfocytów białaczkowych, ocena ich apoptozy po 48 godzinnej inkubacji z badanymi lekami oraz ocena ekspresji białek zostały dokonane przy użyciu cytometrii przepływowej. Oznaczenie odsetka komórek ulegających zaprogramowanej śmierci komórki było oparte na ich zdolności do wiązania aneksyny V i jodku propidyny. Na uwagę zasługuje wykorzystanie przez Doktorantkę metody NanoString nCounter® Analysis System. Jest to nowoczesna metoda wysoce multipleksowego liczenia pojedynczych cząstek służąca do oceny ekspresji genów, miRNA, long non-coding RNAs oraz analizy typu Single cells. Doktorantka wykonała w tym celu izolację RNA z komórek przed i po hodowli oraz zbadała jakość całkowitego RNA z wykorzystaniem automatycznej elektroforezy żelowej. Oznaczenia ekspresji genów zostały wykonane w Laboratory of Molecular Diagnostics, Semmelweis University w Budapeszcie, w ramach współpracy z firmą Biomedica. Wnikliwa analiza statystyczna została przeprowadzona przez Doktorantkę z zastosowaniem programu dedykowanego do metody NanoString- nSolver 4.0, który posłużył także do wygenerowania graficznej interpretacji wyników w postaci heat map. Do wyliczenia wartości fold change (FC) szacującej krotność zmian w materiale badanym względem materiału odniesienia Doktorantka użyła programu OmicSelector, natomiast wykresy volcano plot wykonała przy użyciu oprogramowania VolcaNoser. Dobór metod nie budzi zastrzeżeń, jest on bardzo nowoczesny, adekwatny do postawionych celów, a ich opis świadczy o dobrym ich opanowaniu praktycznym przez Doktorantkę.

Wyniki badań zostały przedstawione opisowo, w formie przejrzystych i dobrze skonstruowanych tabel, oraz w formie wykresów. Kolejność prezentacji wyników jest przejrzysta i logiczna. Doktorantka najpierw oceniła cytotoksyczność leków stosowanych w skojarzeniu w odniesieniu do efektu cytotoksycznego wywołanego badanymi lekami zastosowanymi pojedynczo następnie oceniła rodzaj interakcji zachodzącej między nimi, wykazując bardzo silne działanie synergistyczne. W dalszej części kolejno analizuje wpływ leków na apoptozę całkowitą, zmianę potencjału mitochondrialnego oraz ekspresję aktywnych form kaspazy-3,-9 i -8, szczególnie koncentrując się na ocenie ekspresji 13 białek uczestniczących w apoptozie, w tym BCL-2, BAX, BIM, P53, PUMA, NOXA, NOTCH1. Zgodnie z oczekiwaniem leki zastosowane w skojarzeniu silniej indukowały apoptozę komórek PBL niż zastosowane pojedynczo. Do najciekawszych i nowatorskich wyników zaliczyłbym obserwacje, że wenetoklaks 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 statystycznie wzrostem ekspresji *BCL-2*) w porównaniu z materiałem kontrolnym po hodowli. Skojarzenie wenetoklaksu z 2-CdA znamienne zwiększało natomiast ekspresję aż 13 genów (*APAF1*, *BAX*, *BBC3*, *BID*, *BIK*, *BIM*, *CASP3*, *CASP8*, *CASP9*, *FADD*, *NOTCH1*, *P53*, *SMAD3*) i znamienne zmniejszało ekspresję *PMAIP* w porównaniu z materiałem kontrolnym przed hodowlą, oraz zwiększało ekspresję wszystkich genów z wyjątkiem *PMAIP* i *SMAD3* w porównaniu z materiałem kontrolnym po hodowli. Ciekawy wydaje się także brak wpływu badanych leków na ekspresję genu *BCL-2*, podczas gdy ekspresja białka BCL-2 uległa obniżeniu. Doktorantka zauważyła, że wynika to najprawdopodobniej z blokowania miejsca wiązania przeciwciała przez wenetoklaks.

W rozdziale „Dyskusja” Doktorantka omówiła otrzymane wyniki w szeroko zakreślonym kontekście danych literaturowych poświęconych badanemu zagadnieniu. Starła się zinterpretować poczynione przez siebie obserwacje w świetle opublikowanego na ten temat piśmiennictwa, wiedzy dotyczącej biologii komórek białaczkowych oraz, co jest szczególnie cenne, z uwzględnieniem ograniczeń stosowanych przez siebie metod badawczych. Doktorantka dokonała analizy uzyskanych wyników w sposób bardzo ostrożny, wyważony, świadczący o dużej dojrzałości naukowej. Podkreśliła również, że badania te wzbogaciłaby analiza uzyskanych wyników pod kątem stanu mutacyjnego *IGVH* oraz z uwzględnieniem aberracji cytogenetycznych występujących u badanych chorych. Lektura

tego rozdziału po raz kolejny przekonuje czytelnika rozprawy o głębokiej wiedzy Doktorantki i Jej umiejętności twórczego i krytycznego korzystania z piśmiennictwa światowego.

Rozdziały „Obserwacje” oraz „Wnioski” zawierają nie tylko rekapitulację uzyskanych wyników badań, ale też próbę ostrożnej i jednocześnie moim zdaniem trafnej ich interpretacji. Zawarte tam stwierdzenia mają pełne pokrycie w uzyskanych wynikach badań i dowodzą realizacji przez Doktorantkę celów pracy sformułowanych w rozdziale II.

Rozprawę kończy streszczenie w języku polskim i angielskim, spis 165 pozycji piśmiennictwa ułożonych w kolejności cytowań, trafnie dobranych i poprawnie cytowanych w tekście oraz spis 13 tabel i 30 rycin.

Temat pracy jest bardzo aktualny i ważny z punktu widzenia głównie poznawczego oraz potencjalnie również praktyczno-klinicznego. Realizując ją Doktorantka wykazała dojrzałość naukową i udowodniła umiejętność korzystania z piśmiennictwa naukowego, planowania badań, ich realizacji z doбором odpowiednich metod oraz krytycznej i rzetelnej analizy poczynionych obserwacji. Uzyskane wyniki noszą znamiona nowatorstwa oraz mają duże znaczenie poznawcze. Praca zredagowana jest przejrzystym i zrozumiałym językiem.

**Podsumowując, przedstawiona do oceny rozprawa doktorska magister Aleksandry Kubiak zatytułowana: „Wpływ wenetoklaksu (WEN) i kladrybiny (2-CdA) na apoptozę komórek przewlekłej białaczki limfocytowej w badaniach in vitro” stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego i wykazuje teoretyczną wiedzę Doktorantki w zakresie biologii medycznej. Tym samym spełnia ona wszystkie wymogi stawiane rozprawom doktorskim określone w art. 13 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki – Przepisy wprowadzające Ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2022 r.). Mam więc zaszczyt i przyjemność wnioskować do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauk Medycznych Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi o dopuszczenie mgr Aleksandry Kubiak do dalszych etapów przewodu doktorskiego i zgodnie z zasadami przyjętymi przez UM w Łodzi o wyróżnienie pracy.**

KIEROWNIK  
Katedry i Zakładu Immunologii Klinicznej  
Uniwersytetu Medycznego w Lublinie  
prof. dr hab. n. med. Jacek Rolirski

