

Kielce, 5.05.2022

Dr hab. Michał Arabski  
Zakład Biologii Medycznej  
Wydział Nauk Ścisłych i Przyrodniczych  
Uniwersytet Jan Kochanowskiego w Kielcach

## RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

mgr Sylwestra Głowackiego

*Reaktywne formy tlenu i zaburzenia metabolizmu mitochondrialnego w oporności komórek przewlekłej białaczki szpikowej na działania inhibitorów kinaz tyrozynowych*

Przewlekła białaczka szpikową należy do grupy nowotworów mieloproliferacyjnych charakteryzujących się niekontrolowany wzrost komórek szpiku na różnych etapach. Obecność onkoproteiny BCR-ABL przyczynia się do niestabilności genomowej, genetycznej dywersyfikacji, ekspansji klonalnej oraz selekcji. Mechanizmy te składają się na złożony mechanizm ewolucji klonalnej, której przebieg wiąże się ze stopniem zaawansowaniem choroby. Odkrycie ponad 20 lat temu swoistych inhibitorów kinazy tyrozynowej BCR-ABL zrewolucjonizowało leczenie pacjentów z przewlekłą białaczką szpikową. Skuteczność leczenia pacjentów i rokowanie uległy znacznej poprawie, a postęp w stosowaniu inhibitorów kinazy tyrozynowej trwa. Istotnym elementem badań o charakterze terapeutycznym jest nie tylko poszukiwanie nowych inhibitorów jak drugiej generacji w porównaniu do imatinibu, lecz również ciągła ocena skuteczności leczenia, w tym poszukiwanie potencjalnych mechanizmów indukujących oporność komórek przewlekłej białaczki szpikowej.

W zakres poznawczy powyższych, aktualnych badań wpisuje się tematyka recenzowanej pracy doktorskiej tj. roli stresu oksydacyjnego w wytworzeniu oporności komórek przewlekłej białaczki szpikowej na imatinib. Praca doktorska mgr Sylwestra Głowackiego została wykonana pod kierunkiem prof. dr hab. Tomasza Śliwińskiego i udziałem dr Eweliny Synowiec w roli promotora pomocniczego w Katedrze Genetyki Molekularnej Instytutu Biochemii Uniwersytetu Łódzkiego. Układ rozprawy doktorskiej jest o prawidłowy o strukturze tradycyjnej dla prac doświadczalnych. W poniżej recenzji odniosłem się do jej poszczególnych części (rozdziałów):

### *Cześć teoretyczna*

W rozdziale tym, mgr Sylwester Głowacki w sposób syntetyczny w nawiązaniu do prowadzonych badań, wprowadza czytelnika w zakres tematyczny i cel pracy. W pierwszej części Doktorant

omawia podłoże genetyczne chronicznej białaczki szpikowej jako skutek translokacji chromosomowej z omówieniem struktury chromosomu Philadelphia oraz aktywności domen funkcjonalnych w obrębie białka BCR-ABL. Część druga wprowadzenia to przegląd strategii terapeutycznych stosowanych od początku XX wieku tj. bulsulfan jako czynnik alkilujący DNA, hydroksymocznik jako inhibitor reduktazy rybonukleotydowej, terapie jedno- lub wielolekowe oparte na interferonie alfa oraz inhibitory kinaz tyrozynowych II generacji. Szczególną uwagę, zgodnie z tematyką pracy, mgr Sylwester Głowacki poświęca na imatinib jako inhibitor kinaz tyrozynowych, z uszczegółowieniem mechanizmów oporności na lek na poziomie cytogenetycznym i molekularnym. Doktorant omawia również metabolizm reaktywnych form tlenu w kontekście potencjalnej strategii terapeutycznej z wykorzystaniem dodatkowych obok imatinibu induktorów apoptozy. Zagadnienie to nawiązując do tematyki pracy, stanowi pośrednio uzasadnienie podjętej pracy naukowej. W części teoretycznej pracy Autor wykorzystał aktualne informacje opublikowane na łamach prestiżowych czasopism naukowych z obszaru tematycznego rozprawy. W tym punkcie recenzji mam pytanie do Doktoranta dotyczące wyjaśnienia zależności pomiędzy opornością na imatinib w przebiegu przewlekłej białaczki szpikowej, produkcją RFT, a rolą STAT5 i nieprawidłowościami szlaku białka p53. Proszę również o rozwinięcie zgadnienia związanego z zastosowaniem interferonu alfa, a zmniejszeniem wykrywalności chromosomu Philadelphia (str. 23).

#### *Uzasadnienie i Cel pracy*

Cel pracy sformuowany jest w sposób klarowny i jednoznaczny. Na zadanie to mające na celu określenie roli reaktywnych form tlenu i zaburzeń metabolizmu mitochondrialnego w wytworzeniu oporności komórek przewlekłej białaczki szpikowej na imatinib, składają się cele szczegółowe. Cele te zostały osiągnięte poprzez szereg oznaczeń tj. fizjologicznych i indukowanych poziomów RFT, uszkodzeń DNA, aktywności i form GSH, GPx, katalazy, dysmutazy ponadtlenkowej, potencjału mitochondrialnego oraz liczby kopii i uszkodzeń mtDNA. Podjęcie realizacji celu rozprawy doktorskiej zostało uzasadnione stosownym odniesieniem do danych literaturowych dotyczących charakterystyki oznaczonych w pracy parametrów/białek i ich potencjalnego związku z rozwojem lub progresją chorób nowotworowych oraz lekoopornością.

#### *Materialy i Metody*

Badania naukowe przeprowadzono na czterech, zdefiniowanych i prawidłowo dobranych liniach komórkowych, co umożliwiło uprawione wnioski na podstawie uzyskanych wyników tj. niebiałczkowe komórki kontrolne 32D P, białczkowe komórki 32D BA S i 32 BA R, odpowiednio wrażliwe i wykazujące pierwotną oporność na imatinib oraz 32 BA AR charakteryzujące się opornością nabytą na badany inhibitor. Doktorant wykorzystał w badaniach m in. zestawy

komercyjne w ramach poszczególnych oznaczeń określonych w celach szczegółowych rozprawy z odnośnikami literaturowymi do protokołów. Podstawy teoretyczne oznaczeń zostały zobrazowane schematami, jednak w niektórych opisach brak jest informacji dotyczących stężeń, czy ilości komórek użytych w doświadczeniach. Informacje te, jako mimo wszystko podstawowe, powinny być uwzględnione w opisie metody, w tekście rozprawy. Uwaga ta nie wpływa na wartość merytoryczną pracy. Dobór metod uważam za prawidłowy, a sugestie związane z ich opisem należałoby uwzględnić jako generalne, przygotowując opis metod w ramach publikacji.

### *Wyniki*

Doktorant w usystematyzowany sposób zinterpretował wyniki prac doświadczalnych odnosząc się do kolejnych etapów badań. Pod kątem graficznym, jedynie nie tyle jakość, co wielkość obrazów mikroskopowych (Ryc.12) powinna być większa, co ułatwiłoby obserwację różnic w wielkości i jednorodności poszczególnych populacji linii komórkowych użytych w pracy. Ponadto, obrazy te mogłyby być podstawą do analiz ilościowych z wykorzystaniem darmowych narzędzi graficznych dedykowanych do badań biologicznych jak oprogramowanie imageJ. Wnioskowanie na podstawie uzyskanych wyników jest rozważnie na podstawie rycin uwzględniających analizę statystyczną danych doświadczalnych. Analiza ekspresji BCR-ABL1 na poziomie RNA oraz białka wykazała oczekiwane różnice pomiędzy zastosowanymi w pracy liniami komórkowymi, co potwierdziło zasadność ich wyboru. Podobnie, badania dotyczące wrażliwości linii komórkowych na imatinib wskazały na oporność 32D P, 32 BA R oraz 32 BA AR. Zaobserwowano, iż komórki transformowane onkogenem BCR-ABL1 charakteryzuje wzrost produkcji endogennych RFT zarówno w warunkach kontrolnych, jak i symulujących egzogenny stres oksydacyjny. Efekt ten był modulowany w obecności imitanibu, o którego szczegółowe wyjaśnienia proszę podczas obrony rozprawy doktorskiej. Najwyższy poziom uszkodzeń DNA zaobserwowano w komórkach transformowanych BCR-ABL1 wrażliwych na imitanib w obecności inhibitora zwłaszcza w warunkach kontrolnych. Istotnym wynikiem badań są różnice w poziomie całkowitego GSH oraz aktywności katalazy oraz dysmutazy ponadtlenkowej zależnej od wrażliwości badanych linii komórkowych na imitanib oraz ich transformacji onkogenem BCR-ABL1 w warunkach kontrolnych oraz symulujących egzogenny stres oksydacyjny. Wnioski płynące z powyższej części badań wskazują na złożoność zjawiska i tutaj w świetle uzyskanych wyników mam pytanie dotyczące możliwości i zasadności wykorzystania modulacji RFT jako strategii wspomagającej działanie chemioterapeutyków. W badaniach potencjału błonowego mitochondriów zaobserwowano jego obniżenie wraz z rozwojem oporności pierwotnej jak i nabytej w porównaniu do kontroli, spadek liczby kopii oraz uszkodzeń mtDNA.

## Dyskusja i Podsumowanie

W tej części pracy Doktorant odnosi się krytycznie to uzyskanych w ramach pracy wyników badań naukowych, konsekwentnie do poszczególnych jej etapów, w zestawieniu do aktualnych danych literaturowych m in. rozbieżności w badaniach genetycznych i biochemicznych. Świadczy to o jego dojrzałości naukowej. Podsumowanie graficzne części doświadczalnej systematyzuje nową wiedzę wytworzoną w ramach rozprawy i wskazują na wielowątkowość podjętej tematyki badań.

Odnosząc się to całości pracy pod kątem edytorskim i stylistycznym, Doktorant stosuje słownictwo naukowe adekwatnie do omawianych zagadnień, jednak z funkcji recenzenta zwracam uwagę na stosowanie potocznych określeń, skrótów myślowych oraz miejscami stylu który utrudnia zrozumienie treści. W pracy występują też nieliczne błędy natury edytorskie. Poniżej przedstawiam zestawienie powyższych błędów, które nie wpływają na wartość merytoryczną pracy: „zrost stężenia”; str. 25, „poziomie zaawansowania ich różnicowania”, str. 26, „po przeniesieniu do warunków in vitro”; str. 28, niedokończone zdanie „Z drugiej strony wyniki te ...”; str. 28, „o ile u stwierdzono u”, str. 29, tabela 1 powinna być na jednej stronie, staranniejsz sformatowana, wers drugi tabela 1 „może być przewyciężona” (dotyczy mutacji), wers czwarty tabela 1 „bezsilna wobec tej mutacji” (dotyczy inhibitora), „różnią się dokładnym miejscem wiązania” str. 31, „jeszcze całkowicie odporne” str. 32, „dociekania do roli RFT”, str. 33, „komórki białaczkowe różnią się od normalnych”, str. 34, „eksperymenty o ile nie zaznaczono inaczej przeprowadzono w trzech egzemplarzach”, str. 59, „w funkcji użytego stężenia”, opis Ryc. 16, „ilość zakumulowanych uszkodzeń DNA”, str. 66, „wykształcenie się oporności”, str. 81.

Podsumowując stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska Pana mgr Sylwestra Głowackiego pt. *Reaktywne formy tlenu i zaburzenia metabolizmu mitochondrialnego w oporności komórek przewlekłej białaczki szpikowej na działania inhibitorów kinaz tyrozynowych* stanowi oryginalne rozwiązanie problem naukowego i spełnia warunki 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 (Dz. U. nr 65, poz. 595 z późn.zm). Rozprawa doktorska prezentuje ogólną wiedzę teoretyczną Kandydata w dyscyplinie nauk biologicznych oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Wnoszę do Komisji Uniwersytetu Łódzkiego ds. stopni naukowych w dyscyplinie nauki biologiczne o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie Pana mgr Sylwestra Głowackiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

dr hab. Michał Arabiś  
Uniwersytet Jana Kochańskiego  
w Kielcach