

Recenzja rozprawy doktorskiej

mgr inż. Klaudyny Fidyt

pod tytułem

„Ocena układu tioredoksyny jako nowego celu terapeutycznego w ostrej białaczce limfoblastycznej z prekursorów limfocytów B”

Przetawiona do recenzji rozprawa doktorska mgr inż. Klaudyny Fidyt została wykonana pod kierunkiem Pani dr hab. Magdaleny Winiarskiej oraz pod opieką promotora pomocniczego Pani dr Małgorzaty Firczuk w Zakładzie Immunologii, Wydziale Lekarskim Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego. Praca doktorska była realizowana przy wsparciu finansowym pochodzącym z grantu SONATA BIS NCN nr 2015/18/E/NZ5/00723 pt. „Badanie skuteczności nowych pro-oksydacyjnych strategii w leczeniu ostrej białaczki limfoblastycznej B komórkowej”; grantu ETIUDA NCN nr 2019/32/T/NZ5/00241 pt. „Ocena układu tioredoksyny jako nowego celu terapeutycznego w ostrej białaczce limfoblastycznej B komórkowej”, którego kierownikiem była doktorantka oraz grantu finansowanego przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego w ramach programu "Regionalna Inicjatywa Doskonałości" (RID) nr 013/RID/2018/19 pt. „Strategia rozwoju badań naukowych w dziedzinie immuno-onkologii (iONKO)”.

Problematyka pracy doktorskiej dotyczy zagadnień związanych z molekularnymi mechanizmami odpowiadającymi za przebieg i nabywanie oporności na leczenie podtypów ostrej białaczki limfoblastycznej z prekursorów limfocytów B (B-ALL, ang. *B cell precursor acute lymphoblastic leukemia*). W szczególności doktorantka skoncentrowała swoje badania na ocenie roli stresu oksydacyjnego oraz układu tioredoksyny w etiopatogenezie i rozwoju lekooporności komórek B-ALL. Doktorantka wykorzystując komercyjnie dostępne linie komórkowe, komórki izolowane od pacjentów reprezentujące różne podtypy B-ALL, kładowle komórek B-ALL z pierwotnymi mezenchymalnymi komórkami macierzystymi pochodzenia szpikowego (BM-MSC) oraz model myszy podjęła próbę odpowiedzi na istotne z punktu medycznego pytanie czy inhibitory układu tioredoksyny mogą w przyszłości znaleźć zastosowanie w leczeniu ostrej białaczki limfoblastycznej z prekursorów limfocytów B, w szczególności w połączeniu ze związkiem celowanym w MLLr ALL.

Postawiony cel naukowy spełnia tym samym wymóg niezbędny dla uznania ocenianej pracy doktorskiej za odpowiadający poziomowi jakim powinna odznaczać się praca doktorska, ponieważ jego realizacja istotnie poszerza dotychczasową wiedzę oraz stanowi przyczynek do oryginalnego rozwiązania problemu naukowego.

Rozprawa doktorska Pani mgr inż. Klaudyny Fidyt została opracowana w sposób typowy dla prezentacji wyników doświadczalnych, obejmuje 150 str. i zawiera następujące rozdziały: spis rycin, wykaz skrótów, streszczenie w języku polskim oraz angielskim, wstęp, założenia i cel pracy, materiały, metody, wyniki, dyskusję, podsumowanie, wnioski, spis literatury oraz skany zgód odpowiednich komisji na przeprowadzenie badań.

Wstęp logicznie oraz konsekwentnie wprowadza czytelnika w zagadnienia poruszane w rozprawie doktorskiej. W oparciu o adekwatną do tematyki literaturę doktorantka dokonała opisu aktualnego stanu wiedzy dotyczącego m.in., ostrej białaczki limfoblastycznej z prekursorów limfocytów B, strategii leczenia B-ALL, charakterystyki molekularnej, epidemiologicznej oraz klinicznej typów B-ALL z rearanżacjami genu MLL, charakterystyki systemów antyoksydacyjnych, przeglądu inhibitorów enzymów antyoksydacyjnych testowanych w badaniach przedklinicznych i klinicznych w różnych typach nowotworów hematologicznych, charakterystyki zewnątrz- i wewnątrz-komórkowych szlaków apoptozy jako jednego z głównych mechanizmów działania związków przeciwnowotworowych oraz przeglądu związków celowanych testowanych przeciwko MLLr ALL.

Do tego rozdziału mam tylko drobne uwagi. Przykładowo, zauważono błędny zapisy rodników w Tabeli 2 zapewne jest to efekt błędu edytorskiego, który niestety w konsekwencji jest błędem merytorycznym. Dlatego w przyszłości Doktorantka powinna zwrócić większą uwagę na poprawność zapisu rodników.

W rozdziale dotyczącym charakterystyki enzymatycznych układów antyoksydacyjnych pominięto informację o udziale części tych systemów także do detoksykacji reaktywnych form azotu. Według recenzenta informacja ta jest istotna, ponieważ w literaturze można znaleźć informacje, wskazujące na zmiany poziomu ekspresji genu *iNOS* u pacjentów z B-ALL podczas leczenia. Dodatkowo, Doktorantka musi pamiętać, że równowaga redoks jest warunkowana nie tylko dynamiką generowania oraz detoksykacji reaktywnych form tlenu, ale także interakcji zachodzących wewnątrz komórek pomiędzy tymi reaktywnymi formami tlenu oraz różnymi grupami związków, w tym tlenku azotu, lipidów, cukrów itp., przykładowo tlenek azotu (NO)

może wchodzić w reakcję z anionorodnikiem ponadtlenkowym ($O_2^{\cdot-}$), tworząc nadttlenoazotyn ($ONOO^{\cdot-}$).

Opis wykorzystanych linii komórkowych, układów eksperymentalnych, materiału klinicznego oraz zastosowanych technik i procedur laboratoryjnych został dokonany z należytą starannością i pozwala na dokładne prześledzenie wszystkich etapów przeprowadzonych eksperymentów. W rozdziale Metody opisano wszystkie procedury eksperymentalne wykorzystane do weryfikacji hipotezy badawczej oraz osiągnięcia zdefiniowanych przez Doktorantkę celów pracy. Recenzent nie ma wątpliwości, że jakość merytoryczna oraz ilość użytych metod, zastosowanych technik oraz narzędzi eksperymentalnych świadczy o bardzo dobrym warsztacie Doktorantki.

Drobnym mankamentem tego rozdziału jest natomiast brak tabelarycznego zestawienia charakterystyki materiału klinicznego użytego w pracy (takich jak wiek pacjenta, zastosowane leczenie lub inne procedury, które mogą mieć znaczenie dla końcowych wyników wykonanych eksperymentów, indywidualna charakterystyka fenotypowa z wykorzystaniem cytometru lub wynik diagnostyki klinicznej z wykorzystaniem narzędzi molekularnych, stwierdzone dodatkowe mutacje lub odstępstwa od typowego obrazu dla B-ALL). Tabela taka mogłaby zostać dołączona jako suplement do pracy doktorskiej i pozwoliłaby czytelnikowi na łatwiejszą ocenę użytego materiału do pracy badawczej.

Rozdział zawierający prezentację oraz opis wyników stanowi cenne źródło wiedzy naukowej. Prezentacja wyników została usystematyzowana w sposób tworzący logiczny ciąg zmierzający do udzielenia odpowiedzi na zdefiniowane w pracy doktorskiej cele. Wyniki zostały przedstawione na bardzo dobrze opracowanych 30 rycinach oraz dodatkowo w jednej tabeli.

Należy podkreślić, że weryfikacja hipotezy badawczej została przeprowadzona z najwyższą starannością. Do swoich eksperymentów Doktorantka wykorzystwała nie tylko dostępne różne komercyjnie linie komórkowe (dokładnie osiem), ale także materiał izolowany od pacjentów, jak również technikę ksenotransplantacji komórek MLLr ALL do myszy z niedoborem odporności.

Do najważniejszych wniosków zaprezentowanych w tej części pracy należy uznać: A) w komórkach izolowanych od pacjentów chorych na B-ALL występują zaburzenia homeostazy redoks; B) komórki B-ALL (linie komórkowe, komórki pierwotne) wykazują zwiększony poziom enzymów z układu tioredoksyny: PRDX1, TXN1, TXNRD1; C) linie komórkowe oraz

komórki PDX B-ALL są wrażliwe na działanie auranofiny oraz adenantyny (inhibitorów układu tioredoksyny) w monokulturze i w ko-hodowli z BM-MSK; D) auranofina wykazuje działanie przeciwnowotworowe *in vivo* w modelu ksenotransplantacji komórek MLLr ALL do myszy; E) wenetoklaks uwrażliwia komórki MLLr ALL na auranofinę w warunkach *in vitro* i *in vivo*; F) kombinacja auranofina + wenetoklaks prowadzi do śmierci komórek MLLr ALL na drodze apoptozy; G) auranofina indukuje NOXA na poziomie transkrypcji, częściowo w wyniku zmian upakowania chromatyny w obrębie genu *PMAIP1*.

Przedstawione w pracy wnioski, zakres i jakość zaprezentowanych wyników wskazuje, że Doktorantka przedstawiła oryginalne rozwiązanie problemu naukowego i tym samym spełniła ustawowy warunek stawiany pracom doktorskim. Po przeczytaniu i merytorycznej analizie tego rozdziału recenzentowi nasunęło się jednak kilka pytań. Rycina 6 prezentuje porównanie „ilość mRNA kodującego enzymy należące do układu tioredoksyny w liniach komórkowych B-ALL” - czy doktorantka nie ma obaw, że takie nierówne grupy badane „limfocyty B (n=2), centroblasty (n=2) oraz linie komórkowe B-ALL (n=6)” mogą zaburzać przeprowadzoną analizę statystyczną? Czy doktorantka sprawdziła liczbę kopii analizowanych genów *PRDX1*, *TXN1*, oraz *TXNRD1* w poszczególnych liniach komórkowych? Czy obserwowana zmienność w ekspresji genów w liniach komórkowych B-ALL nie wynika z posiadania różnej ploidalności lub dodatkowych aberracji chromosomowych tych komórek? Stwierdzenie, że wzrost ekspresji *TXNRD1* wskazuje zaburzenia homeostazy redoks komórek B-ALL nie jest w tym miejscu do końca uprawiony. Należałoby bowiem wskazać poziom reaktywnych form tlenu oraz poziom uszkodzeń DNA/białek lub peroksydacji lipidów, który byłby bezpośrednim dowodem na zaburzenie wspomnianej równowagi.

W rozdziale wyniki Doktorantka często opisując wyniki otrzymane testem MTT wskazuje, że przy jego użyciu określa „żywołność komórek” co jest błędem. Testem na żywołność jest np. barwienie błękitem trypanu. Z kolei test MTT oparty jest na pomiarze aktywności metabolicznej komórek, a zatem test ten nie może być rozpatrywany jako test żywołności czy liczby komórek czy cytotoksyczności bez zastosowania dodatkowych różnicujących te parametry testów toksykologicznych. Może się bowiem okazać, że część testowanych związków lub określonych ich stężeń będzie indukowało wyłącznie efekt cytostatyczny lub cytotoksyczny lub obniżało metabolizm komórki. Dlatego recenzent sugeruje w kolejnych pracach Doktorantki używać zamiast „% żywołności komórek” „% aktywnych metabolicznie komórek”.

Wyniki na rycinie nr 10 wskazują, że zastosowane inhibitory - auranofina oraz adenantyna nie są obojętne dla zdrowych komórek PBMC. Czy obserwowane efekty były wywołane działaniem cytotoksycznym czy raczej cytostatycznym zastosowanych leków? Zaprezentowany wynik nie rozstrzyga tej kwestii.

Z kolei w rozdziale opisującym mechanizm działania auranofiny w komórkach B-ALL Doktorantka przywołuje wyniki opublikowane ze swoim udziałem (jako autora wiodącego) oraz podsumowuje, że auranofina prowadzi do akumulacji reaktywnych form tlenu oraz indukuje aktywację szlaków odpowiedzi na stres komórkowy związanych z ER. Natomiast należy zauważyć, że Doktorantka nie pokazuje w dysertacji ani w przytoczonej publikacji kompleksowej analizy aktywacji białek szlaku stresu ER, a tylko wybrane białka wspomnianego szlaku. W tym miejscu należy zaznaczyć, że stres ER może być aktywowany zależnie i niezależnie od reaktywnych form tlenu. W jaki sposób Doktorantka rozstrzygnęła tą kwestię? Czy Doktorantka rozważała, że obserwowana śmierć komórek może być indukowana na drodze innego mechanizmu? Przykładowo czy obserwowany efekt wzrostu śmiertelności komórek może mieć związek z inhibicją aktywności proteosomalnej lub inhibicją PI3K/AKT/mTOR? W tej części - zdaniem recenzenta - zabrakło wykonania kontrolnego eksperymentu z wykorzystaniem np. *N*-acetylocysteiny, która pozwoliłaby jednoznacznie potwierdzić, że obserwowane efekty mają związek z reaktywnymi formami tlenu.

Niezależnie od powyższych pytań i wątpliwości zaprezentowane wyniki oceniam wysoko, w szczególności wyniki zaprezentowane w rozdziale dot. poznania roli procesów epigenetycznych w indukcji *PMAIP1* przez auranofinę. Doktorantka wykazała, że auranofina promuje wzrost poziomu acetylacji lizyny 27 histonu 3 (H3K27ac) w obrębie genu *PMAIP1*. W tym miejscu zasadne jest też pytanie czy auranofina modyfikuje poziom acetylo-CoA – należy bowiem zaznaczyć, że acetylacja histonów jest uzależniona od jego poziomu i to właśnie acetylo-CoA może być dodatkowym elementem łączącym efekty stresu oksydacyjnego z obserwowanymi zmianami epigenetycznymi w komórkach B-ALL.

Dyskusja została opracowana w sposób wyczerpujący, wskazując na dużą znajomość problematyki dotyczącej ostrej białaczki limfoblastycznej z prekursorów limfocytów B. Na szczególne podkreślenie zasługuje bardzo wnikliwa krytyczna analiza otrzymanych wyników dotyczących opisanych mechanizmów działania auranofiny oraz potencjalnego zastosowania inhibitorów układu tioredoksyny jako nowego celu terapeutycznego. Podsumowanie zawiera konstruktywne stwierdzenia, a wnioski końcowe są wyważone.

Wniosek końcowy

W podsumowaniu recenzji chciałbym stwierdzić, iż mimo moich uwag, bardzo wysoko oceniam przedstawioną pracę doktorską Pani mgr inż. Klaudyny Fidyt oraz stwierdzam, że spełnia ona wymogi ustawowe stawiane pracom doktorskim, ponieważ udowodniła, że samodzielnie potrafi rozwiązywać sformułowany problem naukowy poprzez odpowiednio zaplanowane eksperymenty, ich interpretację, krytyczną dyskusję oraz wyważone wnioski. W związku z powyższym wnoszę do Rady Dyscypliny Nauk Medycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie Pani mgr inż. Klaudyny Fidyt do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ze względu na wysoką wartość naukową wyników oraz opublikowaną pracę z zakresu tematyki doktoratu z pierwszym autorstwem Pani mgr inż. Klaudyny Fidyt w czasopiśmie *Molecular Oncology* wnioskuję do Dyscypliny Nauk Medycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego o wyróżnienie ocenianej przeze mnie rozprawy doktorskiej.

Rzeszów, 19/04/2021

Dr hab. Maciej Wnuk, prof. UR

