



Śląski Uniwersytet
Medyczny w Katowicach

Znak: SUM/ZHD/2021/ 34

Zabrze, 17 maja 2021 r.

W. Sz. P.
Prof. dr hab. n. med. Hanna Szajewska
Przewodnicząca Rady Dyscypliny Nauk
Medycznych
Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego
ul. Żwirki i Wigury 61
02-091 Warszawa

Katedra i Klinika
Pediatrii, Hematologii i
Onkologii Dziecięcej

41-800 Zabrze,
ul. 3 maja 13-15
www.sum.edu.pl

Kierownik Katedry
Prof. dr hab. n. med.
Tomasz Szczepański
tel.: (+48 32) 3704 214
fax: (+48 32) 3704 379
szczep57@poczta.onet.pl

SEKRETARIAT

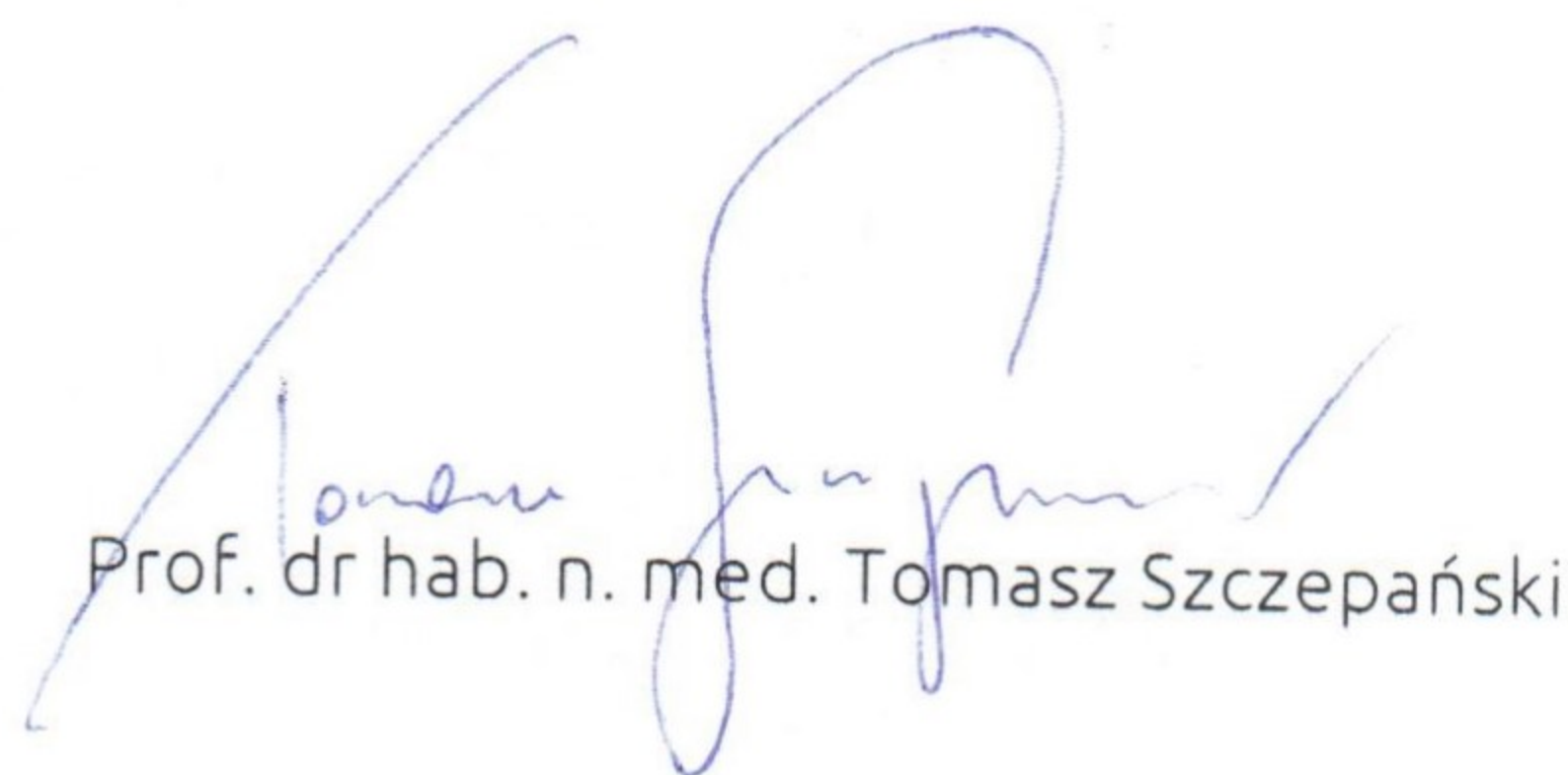
tel.: (+48 32) 3704 372
fax: (+48 32) 3704 379

Wielce Szanowna Pani Profesor,

W załączeniu przesyłam 2 egzemplarze recenzji Rozprawy Doktorskiej mgr inż. Klaudyny Fidył pt.: „Ocena układu tioredoksyny jako nowego celu terapeutycznego w ostrej białaczce limfoblastycznej z prekursorów limfocytów B”.

Pragnę serdecznie podziękować za zaszczyt recenzowania pracy.

Z wyrazami szacunku,



Prof. dr hab. n. med. Tomasz Szczepański



RECENZJA

Rozprawy doktorskiej mgr inż. Klaudyny Fidyt

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

Zgodnie z uchwałą Rady Dyscypliny Nauk Medycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego z dnia 17 marca 2021 roku o powołaniu mnie na recenzenta wyżej wymienionej rozprawy, mam zaszczyt przedstawić poniższą opinię.

Oceniając przedłożoną mi rozprawę na stopień doktora nauk medycznych, dokonam jej charakterystyki w zakresie:

1. wartości celu badawczego,
2. poprawności metodycznej,
3. redakcji przedłożonej pracy,
4. znaczenia wniosków wynikających z przeprowadzonych analiz.

1. Wartość celu badawczego

Wyniki badań naukowych nad ostrą białaczką limfoblastyczną (ALL) u dzieci w ostatnich dziesięcioleciach wykazały, że jest to choroba bardzo różnorodna nie tylko klinicznie, ale również pod względem procesów genetycznych i molekularnych zachodzących w komórkach białaczkowych. Nadal poszukiwane są alternatywne strategie terapeutyczne zwłaszcza dla pacjentów z grupy wysokiego ryzyka. Scharakteryzowanie ekspresji enzymów układu tioredoksyny w ALL z komórek prekursorowych limfocytów B (BCP-ALL) oraz zbadanie, czy enzymy te mogą być nowym celem terapeutycznym stało się przedmiotem ocenianej rozprawy doktorskiej.

We Wstępie Doktorantka w sposób dokładny omówiła najpierw biologię BCP-ALL w kontekście stwierdzanych aberracji genetycznych i molekularnych. Następnie scharakteryzowała obowiązujące protokoły leczenia ALL. Szczególnie dokładnie Doktorantka opisała podtyp BCP-ALL z rearanżacjami genu *MLL*. Kolejny fragment wstępu

poświęcony jest mechanizmom antyoksydacyjnym umożliwiającym przeżycie komórek nowotworowych w warunkach stresu oksydacyjnego. W przypadku nowotworów hematologicznych wywodzących się z limfocytów B, wiele badań wskazuje szczególną rolę układu tioredoksyny we wspieraniu przeżycia komórek nowotworowych. Jak Doktorantka słusznie wskazała, poziom ekspresji oraz wpływ elementów układu tioredoksyny na progresję oraz odpowiedź na terapię nie zostały jak dotąd zbadane w BCP-ALL. Mgr inż. Klaudyna Fidyć następnie scharakteryzowała procesy apoptozy jako jeden z głównych mechanizmów działania związków przeciwnowotworowych i omówiła potencjalne zastosowanie leków blokujących inhibitory apoptozy w terapii BCP-ALL z rearanżacjami genu *MLL*. Z tego i innych fragmentów Wstępu wynika niezbicie, że Doktorantka jest bardzo dobrze zaznajomiona z tematyką wykonywanych badań.

Głównym celem pracy doktorskiej było określenie czy układ tioredoksyny może być nowym celem terapeutycznym dla chorych na BCP-ALL z grupy wysokiego ryzyka. Mgr Klaudyna Fidyć na podstawie podsumowanych we Wstępie informacji postawiła sobie następujące szczegółowe cele pracy:

1. ocenę stresu oksydacyjnego oraz poziomu enzymów układu tioredoksyny w liniach komórkowych oraz w materiale pierwotnym reprezentującym różne podtypy BCP-ALL;
2. zbadanie skuteczności działania inhibitorów układu tioredoksyny *in vitro* na liniach komórkowych oraz w materiale pierwotnym BCP-ALL w monokulturze oraz w ko-hodowli z pierwotnymi mezenchymalnymi komórkami macierzystymi pochodzenia szpikowego (BM-MSC);
3. ocenę działania inhibitorów układu tioredoksyny *in vivo* w modelu mysim;
4. zbadanie przeciwbiałaczkowego działania kombinacji inhibitorów układu tioredoksyny ze związkami celowanymi w leczeniu BCP-ALL z rearanżacjami genu *MLL in vitro* oraz *in vivo*;
5. zbadanie mechanizmu działania najbardziej skutecznej kombinacji inhibitora układu tioredoksyny ze związkiem celowanym w ALL z rearanżacjami genu *MLL*.

Cele te mieszczą się w trendzie nowoczesnych strategii badawczych we współczesnej Europie.

namnażanie komórek pierwotnych w myszach NSG wykazało, że inhibitory układu tioredoksyny wykazują działanie przeciwbiałaczkowe w warunkach *in vitro*.

U myszy NSG, której wstrzyknięto komórki PDX reprezentujące ALL z rearanzacją genu *MLL*, podanie auranofiny powodowało spowolnienie rozwoju białaczki w czasie trwania terapii, jak również po jej zakończeniu. Doktorantka wykazała, że auranofina prowadzi do akumulacji reaktywnych form tlenu oraz indukuje szlaki odpowiedzi na stres komórkowy. Badania w warunkach *in vitro* wykazały, że odpowiedź linii komórkowych BCP-ALL z rearanzacją genu *MLL* na auranofinę wzmacnia się po podaniu wenetoklaksu. Podobnie do wyników uzyskanych w doświadczeniach przeprowadzonych na liniach komórkowych, kombinacja auranofiny z wenetoklaksem wykazała synergizm działania we wszystkich badanych próbkach PDX. Otrzymane wyniki w modelu wykorzystując myszy z niedoborem odporności, NSG pokazują, że w trakcie trwania terapii, wenetoklaks silnie uwrażliwia komórki BCP-ALL z rearanzacją genu *MLL* na auranofinę i blokuje progresję białaczki *in vivo*, indukując śmierć blastów białaczkowych na szlaku apoptozy. Doktorantka wykazała, że apoptotyczna śmierć komórek BCP-ALL jest zależna od poziomu proapoptotycznego białka NOXA, którego poziom wzrasta w wyniku inkubacji z auranofiną. Indukcja NOXA przez auranofinę odbywa się na poziomie transkrypcji, częściowo w wyniku zmian upakowania chromatyny w obrębie genu *PMAIP1*.

Podsumowując, Doktorantka wykazała, że zastosowanie drobnocząsteczkowych inhibitorów specyficznych wobec układu tioredoksyny może być alternatywnym podejściem mogącym znaleźć zastosowanie w leczeniu chorych na BCP-ALL.

3. Redakcja przedłożonej pracy

Rozprawę rozpoczyna spis treści; następnie typowy układ: wykaz rycin: str. 4-5; wykaz tabel: str. 6; wykaz stosowanych skrótów: str. 7-10; streszczenie w języku polskim: str. 11-12; streszczenie w języku angielskim: str. 13-14; wstęp: str. 15-31; założenia i cel pracy: str. 32; materiał i metody: str. 33-58; wyniki: str. 59-94; dyskusja: str. 95-111; wnioski: str. 112 i aneks z Oświadczeniami Komisji Bioetycznych i Komisji Etycznej ds. Doświadczeń na Zwierzętach. W pracy umieszczono 31 tabel i 44 ryciny. Piśmiennictwo (str. 113-128) zawiera 210 pozycji, w tym ponad 200 w języku angielskim i 81 z ostatniego pięciolecia. Praca napisana jest poprawną polszczyzną i ma bardzo staranną szatę graficzną.

2. Poprawność metodyczna

2.1 Materiał i metody

Do eksperymentów *in vitro* wykorzystano ludzkie linie komórkowe reprezentujące różne podtypy molekularne BCP-ALL. Badanie przeprowadzono również na komórkach białaczkowych BCP-ALL pochodzących od dzieci i od dorosłych. BM-MSC wyizolowano od dorosłych przy okazji operacji ortopedycznych. W celu namnożenia komórek pierwotnych BCP-ALL do dalszych testów *ex vivo* oraz *in vivo* wykorzystano model przeszczepienia ludzkich komórek do myszy z obniżoną odpornością, NSG. Poziom reaktywnych form tlenu oznaczono z użyciem odpowiednich barwników. Detekcję badanych białek wykonano metodą Western blotting z użyciem specyficznych przeciwciał. W celu sprawdzenia ilości transkryptów wybranych genów wykonano ilościową reakcję łańcuchową polimerazy w czasie rzeczywistym (qPCR). Właściwości cytotoksyczne/cytostatyczne inhibitorów układu tioredoksyny oraz wybranych leków celowanych oceniono za pomocą testu z wykorzystaniem soli tetrazolowej, MTT. Doktorantka dokonała także oceny działania auranofiny oraz kombinacji auranofiny z wenetoklaksem *in vivo* w modelu ksenotransplantacji komórek BCP-ALL z rearanżacją genu *MLL* do myszy z niedoborem odporności.

Metodyka badań została opisana w sposób staranny i szczegółowy. Spełnia ona kryteria dobrej praktyki badawczej i laboratoryjnej.

2.2 Wyniki

Wyniki zostały przedstawione w sposób szczegółowy i staranny. Porównując markery stresu oksydacyjnego w surowicy chorych na BCP-ALL oraz od zdrowych dawców, Doktorantka wykazała wzrost poziomu metabolitów oksydacyjnych oraz obniżony poziom wolnych grup tiolowych w białkach w grupie BCP-ALL. Ilość mRNA kodującego *PRDX1*, *TXN1*, oraz *TXNRD1* w liniach BCP-ALL kilkakrotnie przekroczyła ekspresję tych genów w próbkach kontrolnych. Zwiększoną ilość mRNA poszczególnych enzymów należących do układu tioredoksyny w porównaniu do komórek kontrolnych zaobserwowano również w materiale pierwotnym, wyizolowanym od chorych na BCP-ALL, zarówno u dzieci, jak i dorosłych. Również dla białek PRDX1 oraz TXN1 zaobserwowano ich podwyższony poziom w liniach komórkowych BCP-ALL w porównaniu do komórek kontrolnych.

Badanie efektu działania inhibitorów układu tioredoksyny na komórkach pierwotnych BCP-ALL i na komórkach PDX (ang. *patient-derived xenograft*) otrzymanych poprzez

4. Wartość wniosków wynikających z przeprowadzonych analiz.

W dyskusji Doktorantka odnosi swoje wyniki do danych z piśmiennictwa światowego. Bazując na swoich doświadczeniach i nielicznych danych z piśmiennictwa słusznie konkluduje, że zmiany markerów związanych z metabolizmem redoks obserwowane w surowicy chorych na BCP-ALL, między innymi podwyższony poziom metabolitów oksydacyjnych oraz obniżony poziom wolnych grup tiolowych w białkach, potwierdzają występowanie stresu oksydacyjnego. Wykazany podwyższony poziom enzymów układu tioredoksyny w komórkach BCP-ALL może być jednym z elementów umożliwiających im przetrwanie w niekorzystnych warunkach stresu oksydacyjnego.

Doktorantka po raz pierwszy wykazała działanie przeciwbiałaczkowe auranofiny *in vivo* w BCP-ALL w modelu ksenotransplantacji komórek białaczkowych do myszy NSG. Wykazane synergistyczne działanie kombinacji auranofina + wenetoklaks na materiale PDX wygenerowanym od chorych na etapie diagnozy oraz wznowy, zarówno dorosłych i dzieci, pokazuje potencjał do szerszego zastosowania tej kombinacji związków w BCP-ALL z rearanzacją genu *MLL*. Jak słusznie Doktorantka konkluduje, aby w pełni ocenić potencjał kombinacji auranofina + wenetoklaks do testowania w badaniach klinicznych w BCP-ALL, konieczne jest przeprowadzenie dodatkowych badań przedklinicznych *in vivo*, zarówno w modelu ksenotransplantacji komórek pierwotnych do myszy NSG, jak również w modelu syngenicznym BCP-ALL.

Sformułowanych dziesięć wniosków stanowią wyczerpującą odpowiedź na postawione cele i zadania badawcze.

WNIOSEK KOŃCOWY

Cel pracy wynika z przedstawionych we Wstępie danych z piśmiennictwa, metodyka badań jest nowoczesna i właściwa, a analiza materiału wnikliwa.

Biorąc pod uwagę wartość merytoryczną pracy, wszechstronny profil eksperymentalny, wkład pracy, przeprowadzenie wnikliwej dyskusji wyników oraz staranną szatę graficzną uważam że Rozprawa Doktorska 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.) w związku z art. 179 ust. 1 ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1669 z późn. zm.).

Na tej podstawie zwracam się do Pani Przewodniczącej Rady Dyscypliny Nauk Medycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie Mgr inż. Klaudyny Fidyty do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Biorąc pod uwagę oryginalność przeprowadzonych badań oraz duży wkład pracy Doktorantki włożony w opracowanie rozprawy doktorskiej, mam zaszczyt wnioskować o wyróżnienie pracy.

Zabrze, 14 maja 2021 r.

KIEROWNIK
Katedry i Kliniki Pediatrii, Hematologii
i Onkologii Dziecięcej
Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach
prof. dr hab. n. med. Tomasz Szczepański
Prof. dr hab. n. med. Tomasz Szczepański