



UNIwersYTET MEDYCZNY
IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH WE WROCLAWIU

**Katedra i Klinika Hematologii, Terapii Komórkowych i Chorób
Wewnętrznych**

ul. Pasteura 4, 50-367 Wrocław
Tel.: 71.784.25.76

Wrocław, dnia 12.11.2024

Ocena rozprawy doktorskiej mgr Agaty Majchrzak

**„Ocena aktywności inhibitorów szlaków mTOR i NFkB oraz białka BCL-2 na komórki
chłoniaka rozlanego z dużych komórek B”**

Niniejsza recenzja została sporządzona w oparciu o uchwałę nr 45/2024 Rady Nauk o Zdrowiu Uniwersytetu Medycznego w Łodzi z dnia 15.10.2014r. Ocenie podlega rozprawa p.t. „Ocena aktywności inhibitorów szlaków mTOR i NFkB oraz białka BCL-2 na komórki chłoniaka rozlanego z dużych komórek B”, na podstawie której Pani **mgr Agata Majchrzak** ubiega się o stopień naukowy doktora.

Przedmiotem ocenianej rozprawy jest zbadanie wpływu inhibitorów wewnątrzkomórkowych szlaków przekazywania sygnału uczestniczących w transformacji nowotworowej, na przeżycie i apoptozę linii komórkowych uzyskanych z chłoniaka rozlanego z dużych komórek B (diffuse large B-cell lymphoma, DLBCL) w warunkach *in vitro*. Podjęty przez Doktorantkę temat jest bardzo ważny z punktu widzenia poznawczego, a przyszłościowo także klinicznego, gdyż wpisuje się w nurt badań nad poszukiwaniem substancji, które mogłyby być wykorzystane w leczeniu tego najczęstszego w naszej populacji agresywnego chłoniaka nie-Hodgkina. Pomimo znacznej poprawy wyników leczenia DLBCL, wciąż istnieje potrzeba doskonalenia terapii, szczególnie w postaciach opornych/nawrotowych, w których rokowanie jest nadal niezadowalające. Stąd też

poszukiwania substancji, mogących mieć potencjalne zastosowanie terapeutyczne w DLBCL, mają istotne znaczenie dla optymalizacji wyników leczenia tej choroby.

Przedstawiona mi do oceny rozprawa, będąca oprawionym introligatorsko wydrukiem komputerowym, jest opracowaniem o typowym układzie, składającym się ze strony tytułowej, dedykacji, wykazu używanych skrótów, spisu treści, wstępu, celów pracy, metod, wyników, dyskusji, wniosków, streszczenia w języku polskim i angielskim oraz wykazu piśmiennictwa.

Rozdział „Wstęp” stanowi wprowadzenie teoretyczne do prezentowanych badań własnych Doktorantki. Można w nim wyodrębnić kilka bloków poruszanych zagadnień. Pierwszy blok stanowi prezentacja podstawowych danych epidemiologicznych, klinicznych oraz kryteriów rozpoznania i czynników prognostycznych DLBCL. W drugiej części Wstępu Doktorantka omawia wewnątrzkomórkowe zjawiska cytogenetyczno-molekularne uczestniczące w transformacji nowotworowej chorób limfoproliferacyjnych. Kolejny blok omawianych zagadnień jest przedstawiony w podrozdziale niezbyt fortunnie zatytułowanym „Zaburzenia w chłoniakach B-komórkowych”. W rzeczywistości w tej części rozprawy Doktorantka omawia rolę białek regulujących apoptozę, w tym rodzinę białek BCL-2, szlaku NFkB oraz mTOR, będących przedmiotem badań Doktorantki. Ostatnia część wstępu jest poświęcona charakterystyce inhibitorów szlaków wewnątrzkomórkowych wykorzystanych w badaniach: ABT-199, obecnie stosowanego w leczeniu pod międzynarodową nazwą wenetoklaks, oraz AZD2014 i IMD0354, będących inhibitorami odpowiednio kinazy mTOR oraz czynnika transkrypcji NFkB. W rozdziale Wstęp Doktorantka zawarła ponadto informacje dotyczące pierwotnego chłoniaka śródpiersia z dużych komórek B (primary mediastinal large B-cell lymphoma, PMBCL), stanowiącego również przedmiot badań. Konstrukcja rozdziału jest logiczna, a wybór przedstawianych informacji, spośród licznych opublikowanych na ten temat danych doświadczalnych i klinicznych, jest przemyślany i trafny, ściśle odpowiadający tematyce przedstawianych dalej badań, a tym samym stanowiący przekonujące teoretyczne uzasadnienie ich podjęcia. Rozdział ten dowodzi dobrego przygotowania teoretycznego Doktorantki do wykonania badań. Doktorantka wykazała się znajomością zarówno strony klinicznej choroby będącej przedmiotem badań, jak i jej skomplikowanych aspektów patogenetycznych na poziomie wewnątrzkomórkowym. Zagadnienia z zakresu biologii molekularnej i komórkowej przedstawione są w sposób czytelny i świadczący o opanowaniu przez Doktorantkę tej trudnej dziedziny wiedzy. Wywiązując się z obowiązku recenzenta, chciałbym sformułować kilka uwag, nie mających istotnego znaczenia dla ogólnie pozytywnej oceny tego rozdziału. Na stronie 4 w podrozdziale 1.1 „Klasyfikacja chłoniaków nieziarnicznych” warto wspomnieć, że w roku

2022, równoległe z piątą edycją klasyfikacji WHO, został opublikowany jeszcze jeden system klasyfikacyjny chorób onkohematologicznych, International Consensus Classification (ICC). Na stronie 7 napisano „Chłoniak DLBCL o kodzie C83.0 w międzynarodowej statystycznej klasyfikacji chorób i problemów zdrowotnych ICD-10...”, podczas gdy kod C83.0 odnosi się do chłoniaków rozlanych z małych komórek. Stwierdzenie na str. 17, że wprowadzenie polatuzumabu zmieniło standard leczenia DLBCL jest nieścisłe. Wykazano co prawda, że zastąpienie winkrystyny przez polatuzumab w schemacie R-CHOP przedłuża przeżycie wolne od progresji (choć nie przeżycie całkowite) chorych na DLBCL, ale standardem postępowania w I linii leczenia DLBCL pozostaje wciąż referencyjny schemat R-CHOP, a pola-R-CHP może być traktowany jako schemat alternatywny. Wspomniane na stronie 23 allogeniczne przeszczepienie komórek krwiotwórczych w PMBCL, podobnie jak w innych agresywnych chłoniakach z komórek B, ma jedynie marginalne znaczenie w niektórych sytuacjach, w chorobie odpornej/nawrotowej.

Rozdział „Cel pracy” (oznaczony omyłkowo w spisie treści i w tekście pracy jako rozdział I) zawiera trzy punkty, które można zbiorczo zrekapitulować jako ocena wpływu *in vitro* inhibitorów trzech wewnątrzkomórkowych czynników prożyciowych (BCL-2, NFκB i mTOR) na żywotność i zjawiska związane z apoptozą komórek 3 linii komórkowych: TOLEDO (GCB-DLBCL), RIVA (ABC-DLBCL) i KARPAS (PMBCL). Nie ulega wątpliwości, że tak określony cel nosi znamiona oryginalności. Jest on bardzo istotny głównie poznawczo, gdyż pozwala na lepsze określenie roli omawianych wewnątrzkomórkowych szlaków prożyciowych w biologii agresywnych chłoniaków z komórek B, ale też może w przyszłości mieć implikacje kliniczne w aspekcie poszukiwania substancji hamujących wewnątrzkomórkowy szlak aktywny w patogenezie tej grupy chłoniaków. Wybór wewnątrzkomórkowych szlaków sygnałowych jako cel zaplanowanych procedur eksperymentalnych jest w pełni uzasadniony aktualnym stanem wiedzy w tym zakresie.

W rozdziale „Metody” Doktorantka szczegółowo przedstawia zastosowane procedury badawcze. Podstawą były 24- i 48-godzinne hodowle komórek linii wywodzących się z DLBCL i PMBCL, inkubowane z wymienionymi wyżej substancjami hamującymi określone prożyciowe szlaki wewnątrzkomórkowe. Efekt działania tych substancji był oceniany cytofluorometrycznie. Żywotność komórek była badana testem z jodkiem propidyny, a apoptoza testem z aneksyną V. Apoptoza wraz prowadzącą do niej kaskadą reakcji wewnątrzkomórkowych oceniana była na podstawie spadku potencjału mitochondrialnego oraz oznaczenia aktywnych kaspaz 3, 8 i 9. Dobór metodyki nie budzi zastrzeżeń, daje ona bowiem wgląd w różne stadia indukowania apoptozy i jest adekwatna do celów pracy. Nie

mam też zastrzeżeń do opracowania wyników badań i zastosowanych metod statystycznych. Warto byłoby jednak podać źródło zastosowanych linii komórkowych i producenta stosowanych substancji inhibitorowych.

Pierwsza część rozdziału „Wyniki” jest poświęcona ocenie cytotoksyczności różnych stężeń badanych leków we wszystkich liniach komórkowych w celu ustalenia optymalnych stężeń do przeprowadzenia właściwych badań. Cytotoksyczność IMD-0354 została również oceniona w stosunku do komórek DLBCL pobranych od pacjenta. Doktorantka wykazała jej zależność od dawki zarówno po hodowli 24- jak i 48-godzinnej. Takie uzupełnienie badań na liniach komórkowych o ocenę *ex vivo* jest bardzo cennym potwierdzeniem cytotoksyczności danej substancji również wobec komórek bezpośrednio uzyskanych od chorego. Należałoby tu jednak dodać informację dotyczącą pacjenta, obejmującą co najmniej podtyp chłoniaka i źródło uzyskanych komórek (bioptat węzła? krew lub szpik w przypadku jego nacieczenia?). Właściwa część badań była poświęcona ocenie wpływu badanych inhibitorów zastosowanych pojedynczo i w skojarzeniach dwóch i trzech substancji na badane parametry żywotności i apoptozy. Doktorantka zaobserwowała, że najsilniejsze działanie proapoptotyczne wykazuje ABT-199 zarówno pojedynczo, jak i w skojarzeniu z AZD2014. Wyjątkiem jest linia TOLEDO, w której nie zaobserwowano różnic pomiędzy badanymi inhibitorami zastosowanymi pojedynczo, a w linii RIVA wykazano podobną skuteczność ABT-199 zarówno w skojarzeniu z AZD201, jak i z IMD0354. Dodanie IMD0354 do skojarzenia ABT-199 z AZD2014 nie wzmacniało działania proapoptotycznego w liniach KARPAS i TOLEDO, a w linii RIVA nie działało silniej niż skojarzenie ABT-199 z IMD0345. Powyższe wyniki przedstawiono w formie opisowej oraz w postaci wykresów kolumnowych z zaznaczonym poziomem istotności statystycznej dla każdej pary oznaczeń. Uzyskane przez Doktorantkę wyniki są bardzo interesujące, gdyż sugerują kierunek dalszych badań nad zastosowaniem tych inhibitorów w klinice, wskazując na potencjalne korzyści wynikające ze skojarzenia inhibitora BCL-2 z inhibitorem mTOR. Szczególnie godna uwagi, jest skuteczność ABT-199 także na linii komórkowej KARPAS, cechującej się nieobecnością ekspresji BCL-2.

Rozdział „Dyskusja” jest stosunkowo krótki (pięć stron), jednak Doktorantka omawia w nim uzyskane wyniki badań w wystarczającym zakresie, sytuując je w kontekście danych piśmiennictwa, ze szczególnym uwzględnieniem już opublikowanych danych na temat zastosowania klinicznego badanych substancji, ich skuteczności i bezpieczeństwa. Doktorantka poświęca dużo uwagi celowości kojarzenia substancji hamujących wzrost nowotworu o różnych wewnątrzkomórkowych punktach uchwytu, jak również trafnie

wskazuje na potencjalne znaczenie kliniczne uzyskanych wyników. Rozdział ten po raz kolejny przekonuje czytelnika o dobrym przygotowaniu Doktorantki do przeprowadzenia badań, jak również o Jej umiejętności krytycznego korzystania z piśmiennictwa i dojrzałej interpretacji uzyskanych wyników. W rozdziale tym warto byłoby rozważyć potencjalny mechanizm skuteczności ABT199 we wspomnianej linii komórkowej KARPAS, cechującej się nieobecnością ekspresji białka BCL-2.

Rozdział „Wnioski” jest rekapitulacją uzyskanych wyników badań, przedstawionych w postaci trzech punktów, omawiających osobno trzy badane linie. Treść tego rozdziału niejako porządkuje mnogość przedstawionych wcześniej wyników badań, stanowiąc ich syntezę i świadcząc o osiągnięciu przez Doktorantkę postawionych sobie celów pracy. Zmuszony jestem jedynie zwrócić uwagę na konieczność ujednoczenia terminologii, gdyż w odniesieniu do inhibitora BCL-2 Doktorantka używa raz określenia ABT-199, a raz wenetoklaks.

Rozprawę zamyka streszczenie w języku polskim i angielskim oraz spis siedemdziesięciu czterech pozycji piśmiennictwa wykorzystanych w dysertacji, ułożonych według kolejności cytowań, właściwie cytowanych w tekście pracy i obejmujących prace oryginalne i przeglądowe w języku polskim i angielskim oraz podręczniki.

W pracy Doktorantka nie ustrzegła się drobnych błędów stylistycznych. Tytuł może z pewnością być sformułowany nie jako ocenę aktywności inhibitorów na komórki chłoniaka ale np. jako wpływ inhibitorów na komórki chłoniaka lub ocena aktywności inhibitorów w komórkach chłoniaka. Przed przygotowaniem publikacji do druku proponowałbym także bardziej czytelne graficzne przedstawienie wyników, gdyż np. lektura ryciny 19 (str. 55), czy ryciny 22 (str 59) wymagają od czytelnika znacznego wyęczenia wzroku.

Sformułowane powyżej uwagi nie mają charakteru zarzutów merytorycznych, a jedynie sugestii nie umniejszających wartości rozprawy. Przedłożoną mi do oceny rozprawę uważam za wartościowe opracowanie naukowe z niewątpliwymi elementami nowatorstwa, posiadające walory poznawcze, pogłębiające wiedzę na temat biologii chłoniaków agresywnych, oraz mające być może przyszłościowo także znaczenie kliniczne. Badania zostały poprawnie zaprojektowane z uwzględnieniem stanu wiedzy w chwili ich podjęcia, a ich wyniki zinterpretowane właściwie i w dojrzały sposób. Realizując badania Doktorantka wykazała dużą ogólną wiedzę teoretyczną, dojrzałość naukową i udowodniła umiejętność korzystania z piśmiennictwa naukowego, planowania badań, ich samodzielnej realizacji z doбором odpowiednich metod oraz krytycznej i rzetelnej analizy poczynionych obserwacji.

Rozprawa doktorska „**Ocena aktywności inhibitorów szlaków mTOR i NFkB oraz białka BCL-2 na komórki chłoniaka rozlanego z dużych komórek B**” spełnia warunki określone w art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003 o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2017, poz. 1789). **Dlatego też mam zaszczyt i przyjemność wnioskować do Rady Nauk o Zdrowiu Uniwersytetu Medycznego w Łodzi o dopuszczenie mgr Agaty Majchrzak do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

Prof. dr hab. Dariusz Wołowicz