



Łódź 2022-05-06

dr. hab. n. med. Hanna Romanowicz, prof. Instytutu  
Zakład Patomorfologii Klinicznej  
Instytut Centrum Zdrowia Matki Polki  
Rzgowska 281/289, 93-338 Łódź

## **RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ**

**Pana magistra Sylwestra Głowackiego**

**pod tytułem:**

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

**Reactive oxygen species and disturbances in mitochondrial metabolism in resistance of chronic myeloid leukemia cells to tyrosine kinase inhibitors.**

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pana mgr. Sylwestra Głowackiego została wykonana w Katedrze Genetyki Molekularnej Instytutu Biochemii pod kierunkiem prof. dr hab. Tomasza Śliwińskiego.

Temat rozprawy obejmuje określenie roli reaktywnych form tlenu i zaburzeń metabolizmu mitochondrialnego w wytworzeniu oporności komórek przewlekłej białaczki szpikowej na działanie inhibitorów kinaz tyrozynowych reprezentowanych przez imatynib.

Imatynib (IM) – inhibitor kinaz tyrozynowych stosuje się w leczeniu przewlekłej białaczki szpikowej. Ten drobnocząsteczkowy inhibitor swoiście hamujący aktywność onkogennej kinazy tyrozynowej BCR/ABL1, odpowiedzialnej za transformację nowotworową krwiotwórczej komórki macierzystej, okazał się zaskakująco skuteczny u większości chorych i zrewolucjonizował terapię przewlekłej białaczki szpikowej.

Mutacje punktowe w genie BCR/ABL1 są wskazywane jako jedna z głównych przyczyn rozwoju oporności na imatynib w trakcie terapii. Wielu pacjentów nabywa w trakcie terapii imatynibem oporności na działanie tego leku, u niektórych pacjentów występuje oporność pierwotna od początku terapii. BCR/ABL1 prowadzi do licznych zaburzeń i zmian w metabolizmie komórek, w tym związanych z produkcją reaktywnych form tlenu (RFT), które między innymi wywołują stres genotoksyczny. Szczegóły zmian metabolicznych a także ich rola w oporności na inhibitor kinaz tyrozynowych jak imatynib wciąż nie są znane. Rozprawa doktorska Pana mgr. Sylwestra Głowackiego wpisuje się w ten ważny i aktualny temat badawczy.

Doktorant podjął się zbadania roli reaktywnych form tlenu i zaburzeń metabolizmu mitochondrialnego w wytworzeniu oporności komórek przewlekłej białaczki szpikowej na działanie inhibitorów kinaz tyrozynowych reprezentowanych przez imatynib.

Przedłożona mi do oceny rozprawa doktorska jest napisana w przystępny sposób a jej logiczny układ ułatwia czytelnikowi śledzenie realizacji celów postawionych w pracy oraz analizę uzyskanych wyników.

Praca ma typową strukturę i składa się ze wstępu, celów pracy, materiałów i metod, wyników, wniosków, dyskusji, piśmiennictwa oraz streszczeń polskich i angielskich. Orientację w tekście ułatwia umieszczony na początku rozprawy „Spis treści”, „Spis ilustracji” oraz „Wykaz skrótów”.

Tytuł pracy jest dobrze i jasno sformułowany oraz właściwie odzwierciedla jej treści.

Wstęp stanowi teoretyczne wprowadzenie do tematyki rozprawy doktorskiej. Jest on napisany w sposób zwięzły, uporządkowany i zrozumiały. Omawiany rozdział rozprawy został potraktowany w sposób wskazujący na wiedzę i rozeznanie doktoranta w tematyce. Zawiera wszystkie najważniejsze informacje z badanej dziedziny. We wstępie doktorant omawia przedmiot pracy w sposób wskazujący na znajomość tematu oraz przedstawia obszerny przegląd literatury. Zdaniem recenzenta ilość pozycji literaturowych jest jednak zbyt liczna przy tak krótkim i zwięzłym wstępie. Poza tym w opinii recenzenta zbyt dużo jest literatury z lat 90-tych ubiegłego wieku. Czy te dane są dalej aktualne?

Zarówno cel główny pracy, jak i cele szczegółowe są sformułowane prawidłowo jednakże w ocenie recenzenta ten rozdział pracy jest zbyt mocno opisowy i powinien być przedstawiony bardziej syntetycznie.

W rozdziale „Materiały i metody” opisana została szczegółowo metodyka oraz obliczenia statystyczne. Część eksperymentalna rozprawy doktorskiej została wykonana prawidłowo. Eksperymenty zostały zaplanowane logicznie z jasno postawionym celem. W

recenzowanej pracy doktorskiej zastosowano cały szereg metod jak: ilościowy PCR, ELISA, obserwacje mikroskopowe czy test kometowy. Zastosowane do przeprowadzenia eksperymentów metody badawcze, świadczą o dobrym opanowaniu warsztatu badawczego i umiejętności jego wykorzystania przez Doktoranta. Niewątpliwie poparciem tej opinii jest fakt, że realizowania przez mgr Sylwestra Głowackiego praca uzyskała finansowanie ze środków Narodowego Centrum Nauki (decyzja numer DEC-2012/05/N/NZ3/01014).

Praca doktorska jest bardzo ładnie opracowana graficznie, z dbałością o szczegóły. Jednakże uwagę recenzenta w przedłożonej mi do oceny rozprawie zwrócił fakt braku informacji na temat źródła pochodzenia zawartych rycin i zdjęć. Recenzent nie wie, czy są to pozycje autorskie czy też zostały zaczerpnięte z innych publikacji, oczywiście za zgodą ich autora. Takie informacje powinny znajdować się pod każdą ryciną czy zdjęciem zawartym w tekście niniejszej rozprawy.

Dokładna analiza uzyskanych wyników została przeprowadzona w sposób poprawny z zastosowaniem właściwie dobranych tabel i rycin. Są one czytelne oraz pomocne w interpretacji uzyskanych przez Doktoranta wyników. Dodatkowo w rozprawie doktorskiej umieszczono zdjęcia testu kometowego i obrazów mikroskopowych co stanowi istotne uzupełnienie pracy.

Na podstawie wyników uzyskanych w badaniach doktorant sformułował trzy główne wnioski, będących bezpośrednim odzwierciedleniem uzyskanych rezultatów.

1. Kinaza BCR-ABL1 modyfikuje metabolizm RFT komórek przechodzących transformację nowotworową w komórki białaczkowe.
2. Wykształcenie oporności na działanie IM prowadzi do dalszych zmian w metabolizmie oksydacyjnym, takich jak podwyższony poziom GSH i zwiększona aktywność GPx i katalazy.
3. Różnice w metabolizmie RFT są ponadto związane ze zmianami w MMP, które różnicują komórki o pierwotnej i nabytej oporności, wskazując, że zmiany metabolizmu mitochondrialnego, w tym związane z aktywnością RFT, mogą odgrywać ważną rolę w tworzeniu oporności nabytej.

Zdaniem recenzenta Wnioski z rozprawy doktorskiej są bardzo trafnie i syntetycznie ujęte. Jednak w opinii recenzenta powinny być wyodrębnione jako osobny rozdział.

Wprowadzenie imatynibu do terapii przewlekłej białaczki szpikowej można już z perspektywy ponad dekady ocenić jako jedno z przełomowych wydarzeń w leczeniu

nowotworów i w historii onkologii. Niestety znacząca grupa chorych z powodu wystąpienia oporności lub nietolerancji nie odnosi spodziewanych korzyści terapeutycznych, co powoduje, że jednym z głównych celów badań stało się poszukiwanie nowych, jeszcze skuteczniejszych leków. W ostatnich 5 latach do terapii wprowadzono inhibitory drugiej generacji (dasatynib, nilotynib, bosutynib), trwają badania kliniczne nad inhibitorami trzeciej generacji (np. ponatynib hamujący zmutowaną kinazę BCR/ABL z mutacją T315I) oraz inhibitorami allosterycznymi, które hamują kinazę w innym mechanizmie, nie wiążąc się z jej centrum aktywnym. Czy Doktorant mógłby wyjaśnić dlaczego w pracy oparł się wyłącznie na działaniu imatynibu? Zdaniem recenzenta wartość pracy zwiększyłoby włączenie do badań oprócz dobrze przebadanego imatynibu innych leków nowszej generacji.

Dyskusja jest napisana w sposób zrozumiały. Przedstawione są najważniejsze zagadnienia związane z przedstawianymi badaniami. Autor dyskutuje swoje wyniki w sposób konsekwentny i z odpowiednimi odniesieniami do piśmiennictwa, chociaż i tu podobnie jak we Wstępie zwraca uwagę mała ilość literatury z ostatnich pięciu lat.

Na końcu rozprawy doktorskiej zostały umieszczone dwa streszczenia; odpowiednio w języku polskim i angielskim. Napisane są one w sposób zwięzły, komunikatywny i umożliwiają szybkie zapoznanie się czytającego z tematem już na samym wstępie pracy. W streszczeniach Doktorant zawarł podsumowanie zagadnień omawianych w rozprawie oraz wnioski z przeprowadzonych badań, poprawnie sformułowane i w pełni uzasadnione.

Rozprawa doktorska zawiera piśmiennictwo obejmujące 303 pozycje literaturowe (policzone przez recenzenta) wymienione według kolejności alfabetycznej. Niestety sporym mankamentem jest brak ich numeracji. Uwagę recenzenta zwróciła mała ilość odnośników literaturowych z ostatnich 5 lat. Stanowią one tylko około 13% całego piśmiennictwa.

Jako recenzent muszę wspomnieć o drobnych uchybieniach zauważonych podczas lektury rozprawy. W pracy powinna zostać ujednolicona pisownia genów – zastosowanie kursywy. Niepotrzebne jest rozwijanie skrótów w tekście skoro Doktorant na początku rozprawy zawarł obszerny ich wykaz z pełnym wyjaśnieniem. W celu zwiększenia przejrzystości pracy według recenzenta rozdziały i podrozdziały powinny być ponumerowane. Uwagi te oczywiście nie zmniejszają wartości merytorycznej recenzowanej rozprawy.

Z całą pewnością przedstawiona mi do recenzji rozprawa pt: „Reaktywne formy tlenu i zaburzenia metabolizmu mitochondrialnego w oporności komórek przewlekłej białaczki szpikowej na działanie inhibitorów kinaz tyrozynowych” jest wartościową pracą naukową. Zawarte w niniejszej recenzji uwagi i zapytania w żadnym stopniu nie umniejszają wartości

naukowej dysertacji lecz stanowią element dyskusji z Doktorantem. Doktorant wykazał się umiejętnością formułowania problemów badawczych i rozwiązywania ich przy użyciu metod eksperymentalnych.

Według mnie praca stanowi oryginalne rozwiązanie ważnego problemu naukowego, pokazuje szeroką teoretyczną wiedzę Doktoranta i udowadnia umiejętność samodzielnego prowadzenia przez niego pracy naukowej. Wyniki tej rozprawy mają szansę być w przyszłości publikowane w czasopismach zagranicznych o wysokim wskaźniku oddziaływania (Impact Factor).

Podsumowując, stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny praca doktorska mgr Sylwestra Głowackiego spełnia wszystkie kryteria zgodnie z wymogami Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2003 r. Nr 65, poz 595 z późn. zm.). Wnoszę zatem o jej przyjęcie i o dopuszczenie Pana mgr Sylwestra Głowackiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

dr hab. n. med. Hanna Romanowicz, prof. Instytutu

KIEROWNIK  
Zakładu Patomorfologii Klinicznej  
*Hanna Romanowicz*  
dr hab. n. med. Hanna Romanowicz prof. Instytutu