



# UNIwersytet Medyczny

## IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH WE WROCLAWIU

Prof. dr hab. Beata Sobieszczńska  
Katedra i Zakład Mikrobiologii  
Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu  
im. Piastów Śląskich  
we Wrocławiu

Wrocław, 22 lipca 2020 r.

### **Recenzja rozprawy doktorskiej mgr inż. Aleksandry Kaczorowskiej na temat:**

#### **„Badanie mechanizmu działania inhibitorów metylacji DNA na zmianę właściwości biomechanicznych chemoodpornych komórek ostrej białaczki szpikowej”**

wykonanej pod kierunkiem dr hab. Marty Kopaczyńskiej, prof. ucz. Katedry Inżynierii Biomedycznej, Wydziału Podstawowych Problemów Techniki w Politechnice Wrocławskiej oraz dr hab. Wojciecha Kałasa, prof. PAN, Laboratorium Immunobiologii Molekularnej Nowotworów Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu.

#### **Podstawy niniejszej recenzji**

1. Zlecenie dr hab. inż. D. Roberta Iskandera, prof. uczelni, Zastępcy Przewodniczącego Komisji ds. Stopni Naukowych w Dyscyplinie Inżynieria Biomedyczna w Politechnice Wrocławskiej.
2. Przedłożona do oceny rozprawa doktorska
3. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1669 ze zm.). Art. 179 ustawy z dnia 3 lipca 2018 r.

#### **1. Ogólna charakterystyka rozprawy**

Przedstawiona mi do recenzji dysertacja naukowa dotyczy zmian właściwości biomechanicznych komórek rakowych pod wpływem cytostatyków i inhibitorów metylacji DNA. Doktorantka swoje badania skupiła na ocenie sztywności jąder chemoodpornych komórek ostrej białaczki szpikowej. Wpływ cytostatyków na usztywnianie komórek rakowych, a co za tym idzie także komplikacje naczyniowe i progresję choroby pojawiające się podczas leczenia białaczek, znany jest od dawna. Pęseta optyczna jako narzędzie do pomiaru sztywności komórek leukemicznych po raz pierwszy została zastosowana w 2014 r. Sztywność komórek poddanych działaniu cytostatyków zależy od zmian w obrębie aktywnego cytoszkieletu komórki oraz błon

cytoplazmatycznych. Niewiele wiadomo natomiast o roli sztywności jąder komórek rakowych poddanych działaniu konkretnych cytostatyków. Stąd, podjęty przez mgr inż. Aleksandrę Kaczorowską temat jest istotny z poznawczego i praktycznego punktu widzenia.

## **2. Struktura rozprawy**

Rozprawa doktorska Pani mgr inż. Aleksandry Kaczorowskiej obejmuje 128-stronicowe opracowanie składające się z 11 rozdziałów tj. streszczenia w j. polskim i w j. angielskim, spisu treści, wykazu skrótów zastosowanych w dysertacji, 21-stronicowego wstępu oraz celu i tezy pracy, części eksperymentalnej z graficznym streszczeniem tezy pracy, materiałów i metod zastosowanych w badaniach, następnie analizy wyników badań i podsumowania. Rozprawę doktorską kończą rozdziały prezentujące oryginalny aspekt wykonanych badań, dorobek naukowy Doktorantki, spis tabel, rycin oraz bibliografię. Wyniki badań Doktorantka zobrazowała 28 rycinami oraz 19 tabelami.

Streszczenie zawiera wprowadzenie do tematu, cele pracy, krótki opis wykonanych badań i ich wyniki. Wstęp zawiera najważniejsze informacje na temat ostrej białaczki limfatycznej, kryteriów jej rozpoznawania oraz leczenia i związanych z tym problemów, tj. oporności na stosowane cytostatyki, nawroty i progresję choroby. Na koniec wstępu Doktorantka opisuje nowoczesne techniki optyczne takie jak holograficzna pęseta optyczna oraz pułapowanie optyczne, które znajdują zastosowanie w badaniach różnych parametrów komórek. Rycina obrazująca pułapkę optyczną jest tu bardzo pomocna. Rozdział ten jest wyczerpujący i w rzetelny sposób opisuje narzędzia badawcze Doktorantki.

Cel pracy jest sformułowany jasno. Trzy tezy pracy opisane na zakończenie tego rozdziału są klarownie i poparte ryciną, co znacząco ułatwia zrozumienie do czego dąży w swych badaniach Doktorantka.

Niezwykle rzetelnie i szczegółowo opisane zostały metody badań – na ich podstawie można odtworzyć przeprowadzone przez Doktorantkę eksperymenty, co zasługuje na uznanie. Metodologia badań jest właściwie dobrana i pozwalana na wykazanie zmian zachodzących w komórkach rakowych pod wpływem cytostatyków i inhibitorów metylacji DNA. Wyniki badań zostały zaprezentowane poprawnie w postaci tabel i czytelnych wykresów oraz zdjęć. Dobrym rozwiązaniem jest przedstawienie wyników eksperymentów i ich analizy z podziałem na tezy badawcze, co przenosi czytelnika na kolejne poziomy podejmowanych badań, mających na celu udowodnienie słuszności postawionych w pracy tez badawczych. Podsumowanie wyczerpująco reasumuje uzyskane wyniki badań.

Bibliografia, obejmująca 147 pozycji, zawiera prace przede wszystkim z ostatnich 5 lat, nieliczne pozycje to publikacje z lat 2002-2007. Dwie publikacje z lat 1955 i 1979 dotyczą stosowanych i aktualnych technik badawczych.

## **3. Ocena rozprawy**

Tematyka pracy doktorskiej mgr inż. Aleksandry Kaczorowskiej jest atrakcyjna w aspekcie aplikacyjnym i naukowym. Uzyskane wyniki badań wskazują na możliwość zastosowania prostej metody optycznej do diagnostyki chemoodpornych typów białaczek. Ma to doniosłe znaczenie w podejmowaniu decyzji o sposobie leczenia oraz dawkowaniu cytostatyków.

Doktorantka postawiła trzy tezy badawcze, których prawdziwości dowodziła autorskimi eksperymentami.

**Teza I.** Doktorantka podjęła się zbadania czy zmiany cech biomechanicznych komórek ostrej białaczki szpikowej zależą od ich chemooporności na stosowane cytostatyki oraz czy mogą posłużyć do szybkiej identyfikacji chemoodpornych przypadków AML. Głównym narzędziem badawczym była tu pęseta optyczna pozwalająca na ocenę sztywności jąder komórek nowotworowych poddanych biotynylacji, co umożliwiło ich niekowalენტne wiązanie ze streptawidyną na powierzchni kulek polistyrenowych pułapkowanych następnie w układzie optycznym. Badania zostały przeprowadzone na pierwotnych liniach komórkowych wprowadzonych ze szpiku siedmiu chorych z AML oraz pięciu ustalonych liniach komórkowych. Z badanych komórek wyizolowano jądra i poddano je działaniu trzech, różnych stężeń inhibitorów topoizomerazy II, tj. daunorubicyny i epirubicyny, stosowanych do leczenia AML. Na podstawie wykonanych oznaczeń zaobserwowano osobnicze (zależne od linii komórkowej) różnice sztywności jąder komórek nietraktowanych lekami oraz traktowanych cytostatykami, które były niezależne od markerów powierzchniowych CD33+, CD34+ i CD123+, ale zależały od typu mutacji w badanych komórkach nowotworowych oraz od stężenia leku. Wyniki te okazały się jednak niewystarczające do udowodnienia postawionej tezy badawczej, stąd Doktorantka kontynuowała badania stosując tym razem stosowane w leczeniu AML inhibitory metylacji DNA tj. azacytydynę i decytabinę. Wyniki ponownie wykazały, że i te leki wpływają na sztywność jąder komórkowych zależnie od stężenia. Poczynione obserwacje dały podstawę wnioskowi, że zmiany właściwości biomechanicznych jąder komórek nowotworowych poddanych wpływowi cytostatyków wynikają z wpływu tych leków na mechanizmy epigenetyczne. Uzyskane wyniki badań Doktorantka zaprezentowała w dwóch, wysoko punktowanych publikacjach o międzynarodowym zasięgu.

**Teza II.** Jądrowa lokalizacja leku uwrażliwia komórki na topoizomerazę II i stanowi doskonałe narzędzie diagnostyczne do szybkiej identyfikacji chemoopornych komórek nowotworowych. Doktorantka kontynuowała badania wpływu cytostatyków na komórki nowotworowe oceniając zależność lokalizacji leków od wrażliwości na inhibitory topoizomerazy II. Jako narzędzia badawcze wykorzystwała w tej części badań mikroskop konfokalny i cytometrię przepływową. W badaniach z zastosowaniem mikroskopu konfokalnego w próbkach szpiku od dwóch chorych zaobserwowano rozmieszczenie doksyubicyny i epirubicyny w cytoplazmie komórek, natomiast w przypadku daunorubicyny słabą fluorescencję w jądrach komórkowych, co zasugerowało aktywne wypompowywanie leku z jądra komórkowego. Badania te zostały podsumowane stwierdzeniem, że wewnątrzkomórkowa lokalizacja leku może wpływać na zmiany biomechaniczne komórek, zachodzące pod wpływem inhibitorów topoizomerazy II.

Biorąc pod uwagę czasochłonność metod mikroskopowych, dalsze badania zostały wykonane metodą cytometrii przepływowej, którą Doktorantka wykorzystwała po raz pierwszy do tego typu badań. Pionierskim badaniem była izolacja jąder komórkowych w celu określenia akumulacji leku. Niemożność określenia chemooporności badanych linii komórkowych metodą cytometrii przepływowej, skłoniło Doktorantkę do poszukiwania dodatkowych technik badawczych. Zastosowała więc badania uwalniania leku z komórek, co ostatecznie pozwoliło na ustalenie, że daunorubicyna, choć jest biernie pobierana przez komórkę, jest z niej aktywnie usuwana, co może być związane z chemoopornością na cytostatyki.

**Teza III.** Poza opracowaniem skutecznej metody oceny chemooporności komórek nowotworowych, jednym z celów rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Aleksandry Kaczorowskiej były badania nad zwiększeniem skuteczności cytostatyków w chemoopornych przypadkach AML. Doktorantka skupiła się na wpływie inhibitora metylacji DNA tj. decytabiny na skuteczność cytostatyków. Decytabina indukuje zmiany w aktywnym cytoszkielecie, w morfologii i zdolności proliferacji komórek szpiku oraz uwrażliwia je na niektóre cytostatyki. Wykonane badania wykazały synergistyczny efekt decytabiny i cyklofosfamidu, ale nie decytabiny i inhibitorów topoizomerazy II tj. daunorubicyny i epirubicyny. Wskazuje to, że inhibitory metylacji DNA działają synergistycznie tylko z wybranymi cytostatykami.

W swej rozprawie doktorskiej Pani mgr inż. Aleksandra Kaczorowska zaprezentowała szereg pionierskich, oryginalnych i ważnych klinicznie wyników badań, dotyczących zastosowania oceny właściwości biomechanicznych jąder komórkowych w prognozowaniu chemooporności na cytostatyki. Za główne osiągnięcia Autorki w rozprawie uważam opracowanie autorskiego protokołu badania wewnątrzkomórkowej lokalizacji cytostatyków metodą cytometrii przepływowej oraz metody badania uwalniania cytostatyku z komórek białaczki. Badania te mają nieprzecenioną wartość kliniczną, niosąc nadzieję na poprawę zarówno diagnostyki chemoopornych przypadków ostrych białaczek, jak i ich skuteczniejszego schematu leczenia.

Pani mgr inż. Aleksandra Kaczorowska jest autorem i współautorem trzech publikacji (dwóch w tematyce związanej z rozprawą doktorską oraz jednej spoza tematyki rozprawy), a także ośmiu referatów konferencyjnych. Pani mgr inż. Aleksandra Kaczorowska była również wykonawcą w dwóch grantach ministerialnych OPUS.

Dorobek naukowy Doktorantki wskazuje na Jej zaangażowanie w pracy naukowej, co znalazło odzwierciedlenie w przedstawionej mi do recenzji rozprawie doktorskiej. Aktywne poszukiwanie rozwiązań postawionych problemów naukowych za pomocą dostępnych technik badawczych oraz rzetelność prezentowanych wyników badań stanowią godne uznania cechy Autorki rozprawy.

#### **4. Uwagi krytyczne**

Rolą Recenzenta jest m.in. wskazanie zauważonych niedoskonałości rozprawy, co powinno pomóc Autorce w dalszym rozwoju naukowym.

##### **Uwagi merytoryczne i dyskusyjne:**

- a) Zgodnie z opisem metod w badaniach zostały zastosowane ustalone linie komórkowe, m.in. A459, HT-29, jednak w pracy brak jakichkolwiek wyników badań na tych liniach?
- b) Interesuje mnie czy Doktorantka kiedykolwiek porównywała wpływ badanych leków na komórki szpiku od zdrowej osoby? Czy badano kiedykolwiek wpływ cytostatyków na właściwości biomechaniczne zdrowych komórek?
- c) Na stronie 59 przedstawione zostały obserwacje wykonanych eksperymentów. Cyt. *"Wzrost nie zależy od obecności antygenów powierzchniowych"* – jakie antygeny Autorka miała na myśli? Na następnej stronie w tabeli zaprezentowane zostały wyniki dla komórek rakowych o swoistych dla AML antygenach CD33+, CD34+ i CD123+, co pozwala się domyślać, że chodziło o te właśnie antygeny (?).

Podobnie, w opisie obserwacji znajduje się wniosek o mutacji genetycznej FLT-3-ITD – skąd wiadomo, że badane komórki posiadały daną mutację? W metodach brak opisu oznaczania w badanych komórkach markerów powierzchniowych i mutacji, a więc wnioskuję, że Doktorantka ich nie oznaczała. W takim razie skąd te informacje? W materiałach powinna się znaleźć charakterystyka fenotypowa i genotypowa badanych linii komórkowych – nagłe pojawienie się informacji o mutacjach i markerach powierzchniowych u badanych komórek czyni opis uzyskanych wyników niejasnym.

- d) W badaniach udowadniających słuszność tezy badawczej II, dwie próbki zostały odrzucone z dalszych oznaczeń, gdyż istniało podejrzenie cyt. „o występowaniu dwóch lub więcej populacji komórek w obrębie jednego preparatu” (str. 71) – czy to oznacza, że w białaczkach o mieszanych populacjach komórek typu MPAL (mixed-phenotype acute leukemia) przedstawione w rozprawie badania nie mają zastosowania?
- e) Czy doktorantka rozważała wpływ apoptozy (zobrazowanej dla daunorubicyny i epirubicyny na ryc. 7, str. 67) na przeciekanie leku z jądra do cytoplazmy? Apoptoza związana jest z przeciekaniem DNA z jądra komórki, a więc wzrostem przepuszczalności błony jądrowej, co mogło spowodować wyciek leku z jądra i jego lokalizację w cytoplazmie komórki. Daunorubicyna powoduje wzrost sztywności komórek krótko po ekspozycji na lek i raptownie indukuje apoptozę, co może indukować przeciekanie leku do cytoplazmy.

#### **Uwagi redakcyjne:**

- a) Streszczenie pracy jest zbyt obszerne i niepotrzebnie przeładowane szczegółowymi informacjami. Streszczenie, zgodnie z nazwą, powinno w krótki i zwięzły sposób reasumować rozprawę naukową.
- b) Nie rozumiem zawartych w rozdziale Cele pracy opisanych wyników badań? Wyniki badań opisywane są krótko w streszczeniu pracy oraz szczegółowo w rozdziale Wyniki badań. Rozdział Cel badań powinien zawierać tylko i wyłącznie cel podejmowanych badań.
- c) Zastanawiający jest dla mnie brak zastosowania jakichkolwiek metod statystycznych do analiz wykonanych oznaczeń. Meta-analiza porównująca ilościowe wyniki badań podniosłaby wartość naukową rozprawy oraz uwiarygodniłaby uzyskane wyniki.
- d) Czy zwrot „płynna biopsja” oznacza bioptat szpiku? Sądzę, że próbka lub bioptat szpiku byłyby zrzęczniejszym określeniem badanego materiału.
- e) Rażąco stosowanie potocznych zwrotów np. zbiotynylowane białko lub wypłukiwane komórki, a także spolszczanie słów angielskich np. medium zamiast podłoże hodowlane, które choć uchodzą w laboratorium, nie powinny mieć miejsca w dysertacji naukowej jaką jest rozprawa doktorska.
- f) Niestaranny spis publikacji, który zawiera szereg błędów interpunkcyjnych oraz jest napisany niejednolicie – nazwy czasopism są pisane jako skróty lub jako pełne nazwy, co nie powinno mieć miejsca. Pozycje bibliograficzne zamieszczone w wykazie literatury zapisujemy podając najpierw nazwisko autora, następnie inicjał(-y) imienia (imion).

#### **5. Wniosek końcowy**

Rozprawa doktorska Pani mgr inż. Aleksandry Kaczorowskiej prezentuje ważne i cenne z klinicznego punktu widzenia wyniki badań o dużym potencjale aplikacyjnym. Stwierdzam, że

Doktorantka w pełni zrealizowała postawione cele badawcze oraz opanowała podstawy teoretyczne badanego zagadnienia, umiejętność samodzielnego prowadzenia badań naukowych i analizy wyników. Odnoszące się do rozprawy uwagi krytyczne nie mają wpływu na jej wysoką i w pełni pozytywną ocenę.

Podsumowując swoją recenzję, stwierdzam, że rozprawa doktorska pt. *„Badanie mechanizmu działania inhibitorów metylacji DNA na zmianę właściwości biomechanicznych chemoopornych komórek ostrej białaczki szpikowej”* Pani mgr inż. Aleksandry Kaczorowskiej spełnia wymogi osiągnięcia naukowego, o którym mowa w artykule 13 Ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. nr 65, poz. 595 ze zm. Dz. U. z 2005 r. nr 164, poz.1365) stawiane rozprawom doktorskim. Oceniana praca prezentuje wysoki poziom merytoryczny i na tej podstawie wnioskuję do Komisji ds. Stopni Naukowych w Dyscyplinie Inżynieria Biomedyczna Politechniki Wrocławskiej o dopuszczenie Pani mgr inż. Aleksandry Kaczorowskiej do publicznej obrony rozprawy doktorskiej.

