



Dr hab. Andrzej Rapak

INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ
im. Ludwika Hirszfelda
Polska Akademia Nauk

ul. Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław
tel. (071) 337 11 72, (071) 337 12 75, fax: (071) 337 13 82

<http://immuno.iitd.pan.wroc.pl>

Wrocław, 15.04.2019

**Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Kai Frączkowskiej
pt. „Badanie właściwości mechanicznych oraz zmian
nanostrukturalnych zachodzących w strukturach komórkowych
indukowanych antybiotykami aminoglikozydowymi i
antracyklinowymi stosowanymi w chemioterapii nowotworów
złośliwych”.**

Przedstawiona do recenzji rozprawa dotyczy badań wpływu antybiotyków antracyklinowych i aminoglikozydowych na właściwości strukturalne i mechaniczne nici DNA oraz właściwości biomechaniczne komórek blastycznych szpiku i erytrocytów krwi pobranych od pacjentów z ostrą białaczką szpikową. Podjęcie tej tematyki badawczej jest ważne i w pełni uzasadnione. Ostra białaczka szpikowa stanowi około 80% ostrych białaczek u dorosłych i 25% wszystkich białaczek u dorosłych, ale jest stosunkowo rzadka u dzieci, które częściej chorują na ostrą białaczkę limfoblastyczną. Zapadalność na ostre białaczki szpikowe znacznie wzrasta z wiekiem, szczególnie po 70-tym roku życia. Wśród chorych przeważają mężczyźni. Liczba zachorowań na białaczki ciągle wzrasta. Pomimo postępów w terapii, przeżywalność pacjentów z ostrymi białaczkami szpikowymi jest niska.

Przedstawiona do oceny praca obejmuje 145 stron maszynopisu i napinana jest w zasadniczo typowym układzie. Zawiera 4 główne rozdziały: wstęp (30 stron), część doświadczalną (13 stron), omówienie wyników (45 stron) oraz podsumowanie (4 strony). Doktorantka zamieściła również spis treści, listę własnych publikacji i komunikatów zjazdowych, streszczenie pracy w języku polskim i angielskim oraz cel i tezy pracy. Na końcu pracy umieszczono cytowane piśmiennictwo liczące 274 pozycji.

Praca napisana jest poprawnym językiem i dobrze zredagowana. Zawiera tylko nieliczne błędy edytorskie;

Str. 2 Białaczka dorosłych z komórek T powinno być Białaczka z dorosłych komórek T

Str. 5 populacja powinno być populacją

Str. 35 rekacji powinno być reakcji

Str. 35 a pomocą powinno być za pomocą

W pozycjach literaturowych 42, 64 i 143 brak jest stron lub numeru doi.

Określenie „martwica” odnosi się do tkanek i narządów. Komórki ulegają nekrozie.

W obszernym wstępie Doktorantka szczegółowo opisała klasyfikację białaczek, głównie ostrych białaczek szpikowych, ich epidemiologię, etiologię, diagnostykę oraz terapię. Omówiono także mechanizm działania stosowanych antybiotyków antracyklinowych i aminoglikozydowych oraz przedstawiono stosowane w pracy techniki badawcze. Duża liczba cytowanego piśmiennictwa świadczy o dobrym rozeznaniu tematyki pracy przez Doktorantkę. Niektóre rozdziały zostały jednak zbyt obszernie opisane.

Do realizacji zaplanowanych badań Doktorantka dobrała odpowiednie techniki nanoskopowe, takie jak transmisyjna mikroskopia elektronowa TEM, mikroskopia sił atomowych AFM, mikroskopia konfokalna oraz technika pęsety optycznej, które zostały opisane w sposób szczegółowy i klarowny. Badania przeprowadzono na syntetycznych dwuniciowych fragmentach DNA o różnej zawartości par zasad GC oraz dwuniciowym DNA wyizolowanym z grasicy cielej. Druga grupa doświadczeń przeprowadzona została na komórkach blastycznych izolowanych ze szpiku kostnego oraz na erytrocytach krwi pobranych od pacjentów z ostrą białaczką szpikową. Do traktowania DNA oraz komórek użyto antybiotyków antracyklinowych (doksorubicyna, epirubicyna, daunorubicyna) oraz antybiotyków aminoglikozydowych I generacji (neomycyna, kanamycyna) i II generacji (tobramycyna).

Omówienie wyników rozpoczęto od analizy wpływu antybiotyków antracyklinowych na strukturę podwójnej helisy DNA. Stosując technikę mikroskopii sił atomowych badano wpływ antracyklin na interkalację z syntetycznymi fragmentami DNA o różnej zawartości par zasad GC. Zaobserwowany efekt zależny był od stężenia leku. Najsilniejszy efekt wykazano dla doksorubicyny i wzrastał on wraz ze wzrostem zawartości par zasad GC w DNA.

Oddziaływanie antybiotyków aminoglikozydowych z eukariotycznym DNA wykonano przy pomocy metod NMR, AFM i TEM. Stwierdzono, że antybiotyki I generacji neomycyna i

kanamycyna powodują nieodwracalną degradację podwójnej nici DNA, czym można tłumaczyć nefrotoksyczność i ototoksyczność tych antybiotyków. Natomiast tobramycyna, antybiotyk II generacji wykazujący niższą toksyczność, indukowała agregację cząsteczek DNA tworząc różne odwracalne formy strukturalne, głównie toroidy.

Stosując technikę pęsety optycznej stwierdzono, że antracykliny zmniejszają sztywność podwójnej nici DNA, szczególnie o dużej zawartości par zasad GC. Pomiar sztywności komórek blastycznych pozyskanych ze szpiku kostnego pacjentów z ostrą białaczką szpikową nie dały jednoznacznych wyników. Już nietraktowane komórki różniły się znacznie sztywnością. Mogło być to spowodowane różnym genotypem i fenotypem badanych komórek. Badania komórek blastycznych powinny zostać jeszcze bardziej poszerzone i obejmować również mioblasty od osób zdrowych, a otrzymane wyniki pomiarów mechanicznych porównane z poziomem apoptozy.

Wykorzystując naturalną fluorescencję antracyklin badano ich wewnątrzkomórkową lokalizację w komórkach blastycznych oraz erytrocytach przy użyciu mikroskopii konfokalnej. Najsilniej przenikała do jądra komórkowego doksorubicyna, epirubicyna gromadziła się w cytoplazmie a daunorubicyna w przestrzeni okołojądrowej. Uzyskane wyniki były zgodne w wynikami otrzymanymi metodą pęsety optycznej. Stwierdzono również, że obecność w komórkach markerów FLT3 oraz CD123 wiązała się ze słabszą internalizacją antracyklin do wnętrza komórki, głównie do jądra komórkowego.

Na końcu pracy umieszczono podsumowanie najważniejszych osiągnięć pracy, do których należy wykazanie, że antracykliny wiążą się do fragmentów DNA bogatych w pary zasad GC. Pokazanie destrukcyjnego wpływu antybiotyków aminoglikozydowych na podwójną nić eukariotycznego DNA, czym można tłumaczyć toksyczność tych antybiotyków, szczególnie neomycyny. Stosując unikalną technikę pęsety optycznej wykazano wpływ antracyklin na sztywność komórek blastycznych.

Chciałbym prosić Doktorantkę o ustosunkowanie się do kilku kwestii:

- czy pacjenci, od których pobierano próbki do badań, byli wcześniej leczeni antracyklinami lub innymi chemioterapeutykami. Mogło być to jedną z przyczyn uzyskania niejednoznacznych wyników.
- czy możliwe jest zaprojektowanie związku selektywnie interkalującego z DNA komórek nowotworowych
- jaka jest możliwość zastosowania użytych w pracy technik do diagnostyki nowotworów

Podsumowując należy stwierdzić, że Doktorantka zrealizowała postawione cele, a otrzymane wyniki są oryginalne i zostały w większości opublikowane w dwóch czasopismach z listy filadelfijskiej o łącznym współczynniku Impact Factor wynoszącym 5,4. W jednej publikacji Doktorantka jest pierwszym autorem, w drugiej trzecim. Rezultaty pracy przedstawiono również na konferencjach naukowych.

Doktorantka wykazała się bardzo dobrą znajomością tematu i opanowaniem nowoczesnych technik badawczych, które w przyszłości mogłyby znaleźć zastosowanie w diagnostyce oraz do monitorowania przebiegu terapii niektórych nowotworów. Użyte techniki mogą zostać również użyte do opracowania nowych bardziej skutecznych chemioterapeutyków o mniejszych skutkach ubocznych.

Przedstawiona do recenzji praca spełnia wymogi 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. Dlatego stawiam wniosek do Rady Wydziału Podstawowych Problemów Techniki Politechniki Wrocławskiej o dopuszczenie Pani mgr inż. Kai Frączkowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Równocześnie wnioskuję o wyróżnienie pracy.



Dr hab. Andrzej Rapak

Doc. dr hab. Andrzej Rapak
Laboratorium Immunobiologii
Molekularnej Nowotworów
Instytut Immunologii i Terapii
Doświadczalnej PAN we Wrocławiu