



UNIWERSYTET MEDYCZNY W BIAŁYMSTOKU

**WYDZIAŁ
FARMACEUTYCZNY**

Zakład Biotechnologii

15-089 Białystok ,

ul. Kilińskiego 1

Prof. dr hab. Anna Bielawska

Anna.Bielawska@umb.edu.pl



Ocena pracy doktorskiej mgr Aleksandry Zdanowicz pt. „Testowanie nośników kationowych jako potencjalnych terapeutyków w leczeniu nowotworów wywodzących się od limfocytów B”

W ostatnich latach obserwujemy niepokojący wzrost zachorowań na nowotwory wywodzące się z układu krwiotwórczego. Grupa nowotworów B-komórkowych jest bardzo zróżnicowana, należą do nich chłoniaki, niektóre białaczki, oraz szpiczak mnogi. Najczęściej diagnozowanym rodzajem białaczki jest przewlekła białaczka limfocytowa (PBL) – rozrost nowotworowy wywodzący się z limfocytów B. U części pacjentów nowotwór rozwija się powoli i nie wymaga leczenia, zaś u innych choroba szybko postępuje, pojawia się lekooporność, co wymaga wielolekowego leczenia.

Białko błonowe antygen CD20 występujące w ponad 90% chłoniaków komórek B jest głównym celem terapeutycznym przeciwciał monoklonalnych (mAb), przeciwciał bispecyficznych i terapii opartych na chimerycznych receptorach antygenowych (CAR). Przeciwciała anty-CD20 charakteryzują się dobrą tolerancją oraz niewielkimi działaniami niepożądanymi i są z powodzeniem stosowane w schematach wielolekowych, jakkolwiek zastosowane w monoterapii rzadko prowadzą do całkowitego wyleczenia. Od wielu lat podejmowane są próby zwiększenia skuteczności przeciwciał anty-CD20. W zespołach badawczych na świecie trwają intensywne prace nad poszukiwaniem nowych związków zdolnych do uwrażliwienia komórek nowotworowych na działanie przeciwciał anty-CD20. Niezmiernie ważne jest opracowanie bezpiecznych schematów terapeutycznych o jak najmniejszych działaniach niepożądanych. Opracowanie takich terapii

powinno być poprzedzone wnikliwymi badaniami podstawowymi *in vitro* i *in vivo*.

W nurt tych poszukiwań wpisuje się rozprawa doktorska Aleksandry Zdanowicz pt. „Testowanie nośników kationowych jako potencjalnych terapeutyków w leczeniu nowotworów wywodzących się od limfocytów B”. Praca doktorska powstała pod znakomitą kierownictwem Prof. Marty Strugi, zaś promotorem pomocniczym była Dr Beata Pyrzyńska.

Dysertacja mgr Aleksandry Zdanowicz obejmuje trzy artykuły naukowe opublikowane w renomowanych międzynarodowych czasopismach o łącznym IF=18,0 i 420 MEiN, z czego dwie prace są artykułami doświadczalnymi, zaś jedna jest pracą poglądową. Dorobek publikacyjny Doktorantki jest spójny, jednorodny i obejmuje poszukiwania nowoczesnych terapii w chorobach nowotworowych.

Rozprawa doktorska Pani Aleksandry Zdanowicz zawiera 12 rozdziałów, obejmujących: spis treści, spis rysunków, wykaz skrótów, streszczenie i słowa kluczowe, uzasadnienie badań, cel pracy, trzy publikacje, posumowanie i wnioski, zgodę komisji bioetycznej, oświadczenia współautorów oraz spis literatury. Każdy rozdział jest bardzo solidnie i wnikliwie opisany, z dużą dbałością o stronę edytorską. Powyższe dane świadczą o świetnym warsztacie naukowym i badawczym Doktorantki. Rozdział 6 zawarty w rozprawie doktorskiej pt. „Podłoże i uzasadnienie badań naukowych” składa się z czterech podrozdziałów. Jest to bardzo krótkie i zwarte wprowadzenie do lektury trzech artykułów naukowych zawartych w pracy doktorskiej. Doktorantka omawia immunoterapię nowotworów wywodzących się z komórek B, nośniki kationowe, mechanizm działania przeciwnowotworowego salinomycyny oraz profil bezpieczeństwa i toksyczności salinomycyny. Rozdział siódmy dysertacji zawiera cel pracy. Pani Aleksandra Zdanowicz sformułowała pięć celów badawczych dotyczących wpływu nośników kationowych na ekspresję antygenu CD20 i zwiększenie skuteczności terapeutycznej wybranych przeciwciał anti-CD20 w badaniach *in vitro*, *ex vivo* i *in vivo*. Następnie Doktorantka wyznaczała kolejnych pięć celów badawczych, które dotyczyły wpływu salinomycyny na funkcjonowanie mitochondriów oraz na metabolizm komórek chłoniaka Burkitta. W rozdziale tym znajdujemy także wymienione nowoczesne metody służące do realizacji zaplanowanych badań. W rozdziale ósmym rozprawy doktorskiej znajdujemy trzy manuskrypty, w tym dwie prace eksperymentalne i jedną pracę poglądową.

Artykuł pt. „Potassium /sodium cation carriers robustly up-regulate CD20 antigen by targeting MYC, and synergize with anti-CD20 immunotherapies to eliminate malignant B cells” został opublikowany w cenionym czasopiśmie *Haematologica* w 2024 roku. Doktorantka jest pierwszym autorem tej publikacji *ex aequo* z Anną Toruń oraz jest jednym z dwóch autorów korespondencyjnych. Publikacja powstała w ramach realizacji grantów: Narodowego Centrum Nauki (NCN) OPUS18 (2019/35/B/NZ5/01445), OPUS12 (NCN,



016/23/B/NZ5/02622), OPUS20 (NCN, 2020/39/B/NZ6/03513) oraz z grantu finansowanego przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego, grant Diamond (DI2014007344). Badania zawarte w w/w publikacji budzą szczerą podziw recenzentki. W niniejszym artykule przedstawiono innowacyjną, skojarzoną strategię, która pozwala w pełni wykorzystać potencjał terapeutyczny przeciwciał monoklonalnych (mAb) anty-CD20 i terapii T-CAR z wybranymi nośnikami kationów potasowo-sodowych. Elementy nowatorskie tej pracy obejmują identyfikację nowej funkcji nośników kationowych. Badania wykazały, że grupa nośników kationowych, w tym salinomycyna (SAL), monensyna (MON), narasina i nigerycyna, skutecznie zwiększają ekspresję antygenu CD20 na powierzchni komórek nowotworowych wywodzących się z limfocytów B. Jest to niezwykle istotne, ponieważ zmniejszona ekspresja CD20 jest jedną z przyczyn oporności na istniejące terapie anty-CD20. Praca szczegółowo wyjaśnia molekularny mechanizm prowadzący do zwiększonej ekspresji CD20 po zastosowaniu nośników kationowych. Wykazano, że dzieje się to poprzez celowanie w onkogen MYC i jego supresję, który działa jako represor genu MS4A1 kodującego CD20. Jest to kluczowe odkrycie, ponieważ wcześniej rola MYC w regulacji ekspresji CD20 w kontekście nośników kationowych była niejasna. W publikacji potwierdzono synergizm z immunoterapiami anty-CD20: badania wykazały, że nośniki kationowe wykazują synergizm z istniejącymi immunoterapiami anty-CD20 (takimi jak rytuksymab i ofatumumab) w eliminacji złośliwych limfocytów B, zarówno w modelach *in vitro*, *ex vivo*, jak i *in vivo*. To odkrycie dostarcza racjonalnych podstaw do oceny klinicznej nośników kationowych w celu uzyskania lepszych odpowiedzi terapeutycznych u pacjentów z chłoniakami nieziarniczymi (NHL). Praca przedstawia nową koncepcję terapeutyczną, podczas gdy salinomycyna i monensyna były wcześniej badane pod kątem ich zdolności do eliminacji komórek macierzystych raka i komórek chemioopornych, ich zdolność do zwiększania ekspresji antygenu CD20 w niskich dawkach wskazuje je jako potencjalne leki w połączeniu z przeciwciałami anty-CD20 lub terapiami CAR-T. Praca ta dostarcza danych przedklinicznych, które mogą być istotne dla przyszłych strategii terapeutycznych. Badania zostały perfekcyjnie zaplanowane, przeprowadzone i opisane. Są to eksperymenty obejmujące biochemię, biologię molekularną i biotechnologię.

Drugi oryginalny artykuł zawarty w rozprawie doktorskiej pt. „Low-Dose Salinomycin Alters Mitochondrial Function and Reprograms Metabolism in Burkitt Lymphoma” został opublikowany w Int. J. Mol. Sci. 2025 i dotyczy właściwości przeciwnowotworowych salinomycyny. Praca doskonale wpisuje się w kontynuację badań eksperymentalnych Doktorantki. Na podkreślenie zasługuje fakt, że mgr Aleksandra Zdanowicz jest pierwszą autorką tego artykułu i była odpowiedzialna za koncepcję pracy, wykonanie eksperymentów, przygotowanie zarówno wersji pierwotnej, jak i ostatecznej artykułu. Badania zawarte w publikacji powstały dzięki sfinansowaniu ze źródeł zewnętrznych, przez Narodowe Centrum Nauki (grant nr 2019/35/B/NZ5/01445). Salinomycyna

(SAL) pierwotnie została wyizolowana z bakterii *Streptomyces albus* i była szeroko stosowana jako środek przeciwbakteryjny i przeciwgrzybiczny przeciwko bakteriom Gram-dodatnim w weterynarii. W ostatnich latach wielu autorów potwierdziło również jej działanie przeciwnowotworowe w różnych nowotworach złośliwych. W raku wątrobowokomórkowym salinomycyna indukuje zatrzymanie cyklu komórkowego w sposób zależny od linii komórkowej, w raku jelita grubego SAL skutecznie hamuje proliferację guza poprzez hamowanie szlaku sygnałowego Wnt/ β -katenina. SAL w komórkach raka prostaty (PC3), jak i w komórkach raka piersi (SKBR3 i MDAMB468) moduluje dynamikę mitochondriów i promuje mitofagię. Potwierdzono, że SAL wykazuje potencjał terapeutyczny w nowotworach złośliwych komórek B, jednak dokładne mechanizmy molekularne pozostają nadal nie do końca wyjaśnione. W tę tematykę badawczą włącza się praca pt. „Low-Dose Salinomycin Alters Mitochondrial Function and Reprograms Metabolism in Burkitt Lymphoma” opublikowana w Int. J. Mol. Sci. 2025. Doktorantka zbadała wpływ SAL na funkcjonowanie mitochondriów i globalną przebudowę metabolizmu komórek chłoniaka Burkitta. Potwierdziła, że SAL obniża poziom MMP, podwyższa poziom mtROS i indukuje stres oksydacyjny w komórkach chłoniaka Burkitta. Ponadto, Doktorantka potwierdziła, że SAL zaburza oddychanie mitochondrialne, nasila aktywność glikolityczną i obniża wewnątrzkomórkowy poziom argininy. Te nowo odkryte aspekty działania SAL pogłębiają zrozumienie jej właściwości przeciwnowotworowych. Badania wskazują, że w niskich stężeniach salinomycyna wykazuje korzystny profil bezpieczeństwa, jednocześnie efektywnie modulując funkcje mitochondrialne i szlaki sygnalizacyjne komórek. Praca dostarcza dogłębnego zrozumienia wpływu SAL na funkcjonowanie mitochondriów i związane z tym zmiany w profilu metabolicznym komórek nowotworowych. Jest to rozwojowy kierunek badań, obecnie w badaniach przedklinicznych znajduje się kilkadziesiąt nowych pochodnych salinomycyny charakteryzujących się wysokim potencjałem przeciwnowotworowym.

Praca pogładowa Zdanowicz A., Grosicka-Maciąg E. „The Interplay between Autophagy and Mitochondria Cancer” opublikowana w Int. J. Mol. Sci. 2024, 25(17):9143 dotyczy wzajemnych relacji między mitochondriami a autofagią w progresji nowotworów. Doktorantka podkreśla rosnącą wiedzę na temat roli autofagii w rozwoju nowotworów, dokonuje przeglądu biomarkerów związanych z autofagią. Artykuł stanowi kompleksowy przegląd różnych funkcji mitochondriów w komórkach nowotworowych, ze szczególnym uwzględnieniem ich roli w autofagii. Badanie interakcji między autofagią a mitochondriami ujawnia nowe możliwości leczenia nowotworów i może doprowadzić do opracowania skuteczniejszych terapii ukierunkowanych na mitochondria. Praca zawiera także przegląd unikalnych biomarkerów autofagii w różnych typach nowotworów znajdujących się obecnie w badaniach przedklinicznych i klinicznych. Biomarkery związane z autofagią są niezwykle cenne zarówno w diagnostyce, jak i prognozowaniu nowotworów. Pani Aleksandra Zdanowicz jest

pierwszą autorką artykułu pt. „The Interplay between Autophagy and Mitochondria Cancer”, Jej dominujący wkład w powstanie tej interesującej pracy jest niezaprzeczalny.

Rozdział dziewiąty dysertacji pt. „Podsumowanie i wnioski” obejmuje pięć stron maszynopisu. Doktorantka streszcza krótko każdy z trzech artykułów naukowych. Rozdział „Wnioski” jest bardzo zwięzły i budzi pewien niedosyt. Skoro Doktorantka postawiła przed sobą precyzyjnie określone cele (zawarte w dysertacji w 10 punktach), czytelnik oczekuje we wnioskach podobnej formy potwierdzenia realizacji wyznaczonych zadań badawczych.

Praca doktorska Aleksandry Zdanowicz zawiera wiele elementów innowacyjnych, skupia się na opracowaniu nowych strategii przezwycięzania oporności na standardowe terapie przeciwnowotworowe w nowotworach wywodzących się z limfocytów B. Dysertacja rodzi szereg pytań, które mogą stać się podstawę do dyskusji naukowej:

1. Doktorantka bada „grupę nośników kationowych”, skupiając się szczegółowo na salinomycynie (SAL). Jakie konkretne cechy strukturalne i/lub funkcjonalne odróżniają salinomycynę od innych nośników kationowych, które mogłyby być równie obiecujące w leczeniu nowotworów B-komórkowych, i czy przyszłe badania powinny skupić się na identyfikacji i optymalizacji innych związków z tej klasy pod kątem ich profilu skuteczności i bezpieczeństwa?
2. Wykazano, że nośniki kationowe wykazują synergizm z immunoterapiami anty-CD20 w eliminacji złośliwych limfocytów B. Biorąc pod uwagę heterogenność nowotworów limfocytów B, czy istnieją konkretne podtypy nowotworów B-komórkowych lub stadia choroby, w których synergia ta jest najbardziej wyraźna i klinicznie istotna? W jaki sposób można wykorzystać diagnostykę molekularną do predykcji odpowiedzi na takie terapie skojarzone?
3. Praca przedstawia obiecujące wyniki w modelach *in vitro* i *in vivo*. Jakie są najważniejsze wyzwania i przeszkody w przełożeniu tych wyników na udane badania kliniczne u ludzi, zwłaszcza dotyczące farmakokinetyki nośników kationowych, potencjalnych toksyczności ogólnoustrojowych oraz zarządzania heterogennością odpowiedzi pacjentów w środowisku klinicznym?
4. Mechanizm działania salinomycyny obejmuje regulację genu MYC, co prowadzi do zwiększonej ekspresji CD20. Zważywszy na kluczową i złożoną rolę białka MYC w wielu procesach komórkowych, czy długoterminowa modulacja jego aktywności przez nośniki kationowe może prowadzić do niezamierzonych skutków lub sprzyjać rozwojowi nowych mechanizmów oporności, które należałoby uwzględnić w dalszych badaniach?
5. Wyniki badań wskazują, że salinomycyna (SAL) zmienia metabolizm komórek nowotworowych w kierunku glikolizy oraz obniża poziom L-argininy, podkreślają kluczową rolę mitochondriów w jej molekularnym mechanizmie działania. W jaki sposób to specyficzne reprogramowanie metaboliczne wpływa na inne aspekty biologii nowotworu, takie jak angiogeneza, inwazyjność czy zdolność do unikania nadzoru immunologicznego?

Reasumując, przedstawiona do oceny rozprawa doktorska mgr Aleksandry Zdanowicz pt. „Testowanie nośników kationowych jako potencjalnych terapeutyków w leczeniu nowotworów wywodzących się od limfocytów B” zawiera adekwatną do postawionych zadań metodykę, aktualność i wartość praktyczną uzyskanych wyników oraz niezwykle wartościowe publikacje dowodzące ogromnej wiedzy i opanowania tematu przez Doktorantkę. Rozprawę doktorską Aleksandry Zdanowicz pt. „Testowanie nośników kationowych jako potencjalnych terapeutyków w leczeniu nowotworów wywodzących się od limfocytów B” oceniam bardzo wysoko, uważam za bardzo interesującą oraz nowatorską. Ze względu na te walory, pragnę rekomendować recenzowaną pracę doktorską do wyróżnienia. Rozprawa doktorska Aleksandry Zdanowicz pt. „Testowanie nośników kationowych jako potencjalnych terapeutyków w leczeniu nowotworów wywodzących się od limfocytów B” zdaniem Recenzentki w pełni spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim określonych w art.187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 poz.1668 ze zm.).

KIEROWNIK

Zakład Biotechnologii

prof. dr hab. Anna Bielańska