

Dr hab. n. med. Maciej Niedźwiecki
Klinika Pediatrii, Hematologii i Onkologii
Gdański Uniwersytet Medyczny

Gdańsk, 07.09.2023 r.

Ocena rozprawy doktorskiej mgr Bartłomieja Pawlika:

„Wpływ modulacji sygnału mTOR na ekspresję receptorów immunologicznych punktów kontrolnych w komórkach hematopoetycznych”

Promotor: Prof. dr. hab. n. med. Wojciech Młynarski.

Zgodnie z uchwałą Rady Nauk Medycznych Uniwersytetu Medycznego w Łodzi o powołaniu mnie na recenzenta wyżej wymienionej rozprawy, mam zaszczyt przedstawić poniższą opinię. Oceniając przedłożoną mi rozprawę na stopień doktora nauk medycznych, dokonam jej charakterystyki w zakresie wartości celu badawczego, poprawności metodycznej, redakcji przedłożonej pracy oraz znaczenia wniosków wynikających z przeprowadzonych analiz.

RECENZJA:

Ostre białaczki limfoblastyczne (ALL) należą do najczęstszych nowotworów wieku dziecięcego. Intensywnie prowadzone w ostatnich latach badania nad tą grupą chorób doprowadziły do znacznej poprawy wyleczalności aktualnie sięgającej 90%.

Tak wysoki odsetek wyleczalności w tej grupie pacjentów udało się osiągnąć przede wszystkim dzięki starannemu doborowi metody terapeutycznej, co uzależnione jest od obecności korzystnych bądź niekorzystnych czynników rokowniczych. Ostatnie lata to gwałtowny rozwój nowoczesnych metod diagnostyki genetycznej oraz immunologicznej, co niewątpliwie poszerzyło naszą wiedzę o patogenezie chorób nowotworowych i wskazało nowe cele terapii immunologicznych i molekularnych.

Dlatego też uważam podjęcie przez Pana Bartłomieja Pawlika tematu wpływu modulacji sygnału mTOR na ekspresję receptorów immunologicznych punktów kontrolnych w komórkach hematopoetycznych za niezwykle ważną, nowatorską i poszerzającą naszą wiedzę próbę badawczą.

Hematopoeza jest skomplikowanym i uzależnionym od wielu czynników biologicznych procesem, przez co może być zakłócona na wielu etapach przez czynniki genetyczne i epigenetyczne prowadząc do rozrostów białaczkowych. Proces hematopoezy został w sposób przystępny opisany przez mgr Bartłomieja Pawlika we wstępie rozprawy doktorskiej. Opisane zostały też szlaki sygnałowe obecne zarówno w prawidłowej, jak i patologicznej hematopoezie, w tym szlak sygnałowy PI3K/AKT/mTOR oraz jego związek z białkami punktów kontroli immunologicznej. Cytowane w tej części piśmiennictwo jest prawidłowo dobrane i pozwala na uzupełnienie wiedzy przez czytającego.

W tej części rozprawy na podkreślenie zasługuje przystępny sposób prezentacji dostępnej wiedzy pozyskanej przez Doktoranta z aktualnego piśmiennictwa. Przytaczane dane literaturowe pochodzące z badań podstawowych i klinicznych pozwalają na relatywnie łatwe zrozumienie przez czytelnika tych niezwykle skomplikowanych zależności. W mojej ocenie świadczy to o zrozumieniu złożonych zagadnień współczesnej immuno-onkologii oraz genetyki, a także o dojrzałości Doktoranta jako pracownika naukowego i popularyzatora nauki.

Cele pracy zostały sformułowane w sposób jasny i przejrzysty. Doktorant przyjął bardzo ambitne cele badań, które obejmowały ocenę aktywacji szlaku mTOR oraz ekspresji galektyny 1 w komórkach defektywnej hematopoezy w wybranych liniach komórkowych ostrych białaczek, a także analizę powiązań biologicznych pomiędzy tymi parametrami.

Autor pracy bardzo starannie przedstawił wyniki przeprowadzonych badań w formie tabel (3), wykresów oraz rycin (15). Jego rozprawa doktorska ma klasyczny układ. Składa się ze 113 stron i obejmuje: wstęp (strony: 6-26), cel pracy (strona: 27), materiał i metody (strony: 28-34), wyniki (strony: 45-72), dyskusja (strony: 73-83), wnioski (strona: 84), streszczenie w języku polski i angielskim (strony: 85-87), piśmiennictwo (strony: 88-104), objaśnienia skrótów (strony: 105-111) oraz spis rycin i tabel (strony: 112-113). Cytowane piśmiennictwo składa się ze 169 pozycji właściwie dobranych i aktualnych. Na pozytywne odnotowanie zasługuje również szata graficzna rozprawy - praca napisana jest starannym, poprawnym językiem, przejrzysto i spójnie.

Aby zrealizować cele pracy za główny model badawczy Doktorant wybrał linie komórkowe defektywnej hematopoezy, w tym trzy linie ostrej białaczki limfoblastycznej (ALL) i jedną ostrej białaczki promielocytowej (ANLL-M3). W celu walidacji oraz poszerzenia obserwacji Doktorant dokonał również analizy z wykorzystaniem komórek szpiku kostnego lub krwi obwodowej 13 dzieci leczonych w Klinice Pediatrii, Onkologii i Hematologii I Katedry

Pediatrici Uniwersytetu Medycznego w Łodzi. Pomimo małej liczebności oraz niejednorodności tej grupy uzupełnienie badań o pacjentów aktualnie leczonych stanowi niewątpliwie wartościowy dodatek do przeprowadzonych badań i fakty te nie wpływają na ostateczne wyniki. Niewątpliwie faktem scalającym grupę była potwierdzona sekwencjonowaniem nowej generacji (RNA-seq) u wszystkich 13 pacjentów z BCP-ALL obecność fuzji genu KMT2A z trzema różnymi genami partnerskimi.

W mojej ocenie opis zastosowanych przeciwciał, sond fluorescencyjnych, odczynników laboratoryjnych oraz aparatury i sprzętu zastosowanego do przeprowadzenia analiz jest bardzo szczegółowy i wartościowy. W połączeniu z dokładnym opisem prawidłowo dobranych i zastosowanych metod badawczych świadczy o dużym doświadczeniu i wiedzy, jaką posiada Doktorant, a także daje możliwość powtórzenia lub kontynuacji eksperymentu przez innych badaczy.

Kolejna część pracy to szczegółowy opis rezultatów uzyskanych w wyniku licznych eksperymentów przeprowadzonych przez Doktoranta. Ze względu na ograniczoną formę mojej recenzji pozwolę sobie wspomnieć tylko o części z nich.

Wyniki uzyskane w toku oceny ekspresji genów związanych ze szlakiem PI3K/AKT/mTOR w różnych podtypach ostrej białaczki limfoblastycznej pozwoliły na podzielenie podtypów ALL na 4 podgrupy. Dzięki przeprowadzonym badaniom udało się również określić stopień ekspresji wybranych genów w poszczególnych podgrupach. Przykładem może być grupa pierwsza, którą stanowiły podtypy białaczki ETV6::RUNX1 (TEL::AML1) i hipodiploidia, charakteryzujące się najniższą aktywacją szlaku mTOR. W tej grupie najwyższej ekspresji ulegały geny TSC2, STK11, PDPK1, CAB39 i PIK3R5.

Kolejne eksperymenty pokazały, że linie komórkowe ostrej białaczki limfoblastycznej były w różnym stopniu wrażliwe na inhibitor mTOR. Linie komórkowe SUP-B15 i RS4;11 wykazywały silną wrażliwość zależną od stężenia ewerolimusu, natomiast komórki linii SEM-K2 charakteryzowały się niższą ekspresją białka p70 S6 oraz niewrażliwością na stosowany inhibitor.

Niewątpliwie interesującą obserwacją jest również fakt zależności poziomu galektyny 1 w badanych komórkach od podtypu molekularnego białaczki, niemniej jest on ograniczony do komórek z rearanżacjami genu KMT2A (linie RS4;11 i SEM-K2). Białko to ulegało relatywnie wyższej ekspresji w komórkach linii RS4;11 niż w SEM-K2. Zahamowanie szlaku sygnałowego mTOR wpływało na obniżenie poziomu galektyny 1, przy czym efekt ten był silniejszy w

komórkach linii RS4;11. Obserwacja ta nabiera swojego znaczenia szczególnie jeśli pamiętamy, że galektyna 1 jest jednym z ważniejszych białek receptorowych immunologicznych punktów kontrolnych.

Niewątpliwie ważną i interesującą częścią rozprawy jest **Dyskusja** obejmująca 12 stron. Doktorant w sposób kompetentny porównuje wyniki uzyskane przez innych badaczy do wyników badań własnych. W tej części rozprawy zwraca uwagę duża znajomość przedmiotu Doktoranta. Porusza się on swobodnie po literaturze polskiej i światowej z zakresu genetyki oraz immuno-onkologii ostrych białaczek, co nie jest łatwe wobec dużej ilości informacji zaczerpniętych z bogatego piśmiennictwa ujętego w pracy.

Pracę Doktorant kończy 3 poprawnie sformułowanymi wnioskami.

Doktorant słusznie wnioskuje w oparciu o badania własne i dane literaturowe, że udział szlaku sygnałowego PI3K/AKT/mTOR w defektywnej, prowadzącej do rozwoju ALL hematopoezie jest różnorodny.

W mojej ocenie jedną z najważniejszych obserwacji Doktoranta jest fakt pobudzenia szlaku PI3K/AKT/mTOR w podtypach ALL z hiperdiploidią, translokacją t(9;22) oraz t(4;11), a także zależna od dawki wrażliwość tych podtypów na farmakologiczną inhibicję szlaku mTOR. Ponieważ szczególnie podtyp ALL z translokacją t(4;11) związany jest ze złym rokowaniem, poszukiwanie nowych celów terapeutycznych w tym przypadku podnosi wartość przedłożonej mi do recenzji pracy.

Sądzę, że 3-ci wniosek również przybliżył nas do wyjaśnienia skomplikowanych mechanizmów rządzących onkogenezą w ostrych białaczkach i wpisuje się w aktualne trendy naukowe mówiące o dużym znaczeniu immunologicznych punktów kontrolnych wpływających na rozwój i przebieg ALL. Doktorant w swoich badaniach znalazł powiązanie biologiczne pomiędzy aktywnością sygnału mTOR w komórkach ALL oraz ekspresją galektyny 1, która jest uznanym białkiem punktów kontroli immunologicznej.

Niemniej, jak sam Doktorant stwierdził, prowadzone przez niego badania powinny, a w mojej ocenie nawet muszą być kontynuowane w celu wyjaśnienia wielu wciąż nieodkrytych zależności, co może doprowadzić do opracowania nowych strategii terapeutycznych opartych na inhibicji bądź pobudzeniu immunologicznych punktów kontrolnych w źle rokujących białaczkach.

Dołączone w pracy streszczenie w języku polskim i angielskim w pełni oddaje trud włożony w pracę. Tak jak wcześniej zaznaczyłem praca napisana jest stylistycznie poprawnym językiem, przejrzyste i spójnie.

Z obowiązku recenzenta na zakończenie tej części recenzji chciałbym zwrócić uwagę Doktoranta na pewne drobne uchybienia, które wzbudziły moje wątpliwości:

- Na stronie 25 w wersie 16 Doktorant błędnie określił fenotyp limfocytów CD4+Treg jako CD8+, co jest najprawdopodobniej błędem redakcyjnym, na co dowodem jest prawidłowo opisany fenotyp w wersie 27. Niemniej znana jest i opisywana przez badaczy subpopulacja limfocytów regulatorowych o fenotypie CD8+. Stąd moje wątpliwości, o której subpopulacji pisze Doktorant.
- W trakcie analizy tabeli nr 1 nasunęło mi się pytanie: jaka była techniczna przyczyna braku badania kariotypu metodą prążkową u części pacjentów?
- W trakcie recenzowania rozprawy pracy nie znalazłem informacji, czy na swoje badania Doktorant uzyskał zgodę Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi? Domyślam się, że skoro praca była finansowana ze środków grantowych i pacjenci byli lub są leczeni w ramach ośrodka należącego do Polskiej Pediatrycznej Grupy ds. Leczenia Białaczek i Chłoniaków taka zgoda musiała być pozyskana.
- Doktorant w kilku miejscach opisując populacje chorych z danym rozpoznaniem umieszcza informację o medianie wieku zachorowania. Zgodnie z definicją wskazuje ona przeciętny wiek osób w danej populacji i wyznacza granicę wieku, którą połowa osób w danej zbiorowości już przekroczyła, a druga połowa jeszcze nie osiągnęła. Dlatego też, bardziej prawidłowym byłoby podawanie zawsze konkretnej liczby, zamiast informacji „mediana około lat 60” (strona 15 wers 1).

Powyższe uwagi dotyczą redakcyjnej i technicznej strony przedłożonej mi do recenzji pracy mgr Bartłomieja Pawlika i w żadnym stopniu nie wpływają na moją bardzo pozytywną opinię o tej wyróżniającej się pracy.

WNIOSEK KOŃCOWY

W podsumowaniu mojej opinii stwierdzam, że cel recenzowanej pracy wynika z przedstawionych danych z piśmiennictwa, metodyka badań jest niezwykle bogata, nowoczesna i właściwa, a analiza materiału wnikliwa. Dlatego też uważam, że przedstawiona mi do recenzji rozprawa świadczy o zdolności Doktoranta do samodzielnego rozwiązywania problemów naukowych i badawczych w oparciu o posiadaną wiedzę i umiejętności. Praca ta zawiera bez

wątpienia wybitne elementy nowości naukowej, a przedstawione wyniki wskazują, że cele badawcze stawiane przez Doktoranta zostały w pełni zrealizowane. W mojej ocenie zgromadzone wyniki zostały przez mgr Bartłomieja Pawlika fachowo zweryfikowane i w przyszłości będą stanowiły podstawę do ich opublikowania przynajmniej w kilku recenzowanych czasopismach z listy filadelfijskiej.

Biorąc pod uwagę wartość merytoryczną i nowatorską pracy, profil przeprowadzonych analiz w oparciu o bogaty warsztat badawczy, wkład pracy, przeprowadzenie wnikliwej dyskusji wyników oraz staranną szatę graficzną, uważam że Rozprawa Doktorska mgr Bartłomieja Pawlika spełnia warunki 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 (Dz. U. nr 65, poz. 595 z późn. zm.) w związku z art. 179 ust. 1 ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. - przepisy wprowadzające Ustawę Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1669 z późn. zm.).

Na tej podstawie zwracam się do Pani Przewodniczącej Rady Nauk Medycznych Uniwersytetu Medycznego w Łodzi o dopuszczenie mgr Bartłomieja Pawlika do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie, ze względu na nowatorski charakter pracy, bogaty warsztat badawczy oraz szansę na praktyczne wykorzystanie pozyskanej przez Doktoranta wiedzy wnioskuję o wyróżnienie pracy.

Dr hab. n.med. Maciej Niedźwiecki

Maciej Niedźwiecki
Klinika Pediatrii, Hematologii i Onkologii
Gdański Uniwersytet Medyczny