

Dr hab. n med. Łukasz Bołkun

Białystok 30.08.2024

Klinika Hematologii

Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

**Recenzja rozprawy doktorskiej lekarza Kamila Brzozowskiego, „Ocena wybranych receptorów białek mikrośrodowiska szpiku kostnego na powierzchni białaczkowych komórek macierzystych u chorych na ostrą białaczkę szpikową” powstałej w Klinice Hematologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, pod kierunkiem Promotora Prof. dr hab. n. med. Agnieszki Wierzbowskiej oraz Promotora Pomocniczego dr Magdaleny Czamerskiej**

Komórki podścieliska szpiku kostnego spełniają kluczową rolę w przebiegu hematopoezy oraz utrzymywaniu komórek krwiotwórczych w niszy szpikowej, jednakże ich działanie przyczynia się również do większej oporności komórek białaczkowych na terapię. Badania wskazują, że komórki nowotworowe, w tym białaczki, mają zdolność do adaptacji do różnych warunków stresowych, takich jak chemioterapia czy stres wywołany przez onkogeny, poprzez zmianę swoich procesów metabolicznych. W białaczkach, podwyższona aktywność glikolizy jest często wiązana z ich zwiększoną opornością na stosowane terapie. Jednocześnie wykazano, iż komórki niższy hematopoetycznej zapewniają komórkom białaczkowym warunki ochronne przed chemioterapią oraz pozwalają nabywać oporność na chemioterapię. Wykazano .in., iż komórki AML poddane działaniu cytarabiny, głównego składnika standardowej chemioterapii, potrafią tworzyć połączenia międzykomórkowe z komórkami niższy hematopoetycznej oraz pobierać do nich funkcjonalne mitochondria niwelując cytotoksyczne działanie cytarabiny.

Wzajemne interakcje komórek białaczkowych z komórkami podścieliska szpiku zachodzą poprzez szereg układów ligand-receptor w tym np. CXCR4-SDF1 czy Tie2-Ang-1.

Należy podkreślić, iż wykazano, iż zaburzenia oddziaływania chemokiny CXCL12 i receptora CXCR4 mają znaczenie w rozwoju ostrej białaczki szpikowej oraz ostrej białaczki limfatycznej z komórek B. Nadekspresja receptora CXCR4 na komórkach CD34 wiąże się z cięższym przebiegiem białaczek, częstszym występowaniem nawrotów i mniejszą przeżywalnością. Wydaje się także, że zwiększona ekspresja tego receptora może wpływać na przebieg choroby, przyczyniając się – przez oddziaływanie receptora z jego ligandem – do oporności na chemioterapię, zmniejszenia apoptozy komórek rakowych indukowanej cytostatykami. Wykorzystano to proponując w leczeniu ostrej białaczki limfatycznej zastosowanie antagonistów receptorów CXCL12/CXCR4. Cząsteczki te (np. analogi cyklamnu, polihemuzyiny i inne) mogą zmniejszać odpowiedź komórek nowotworowych na CXCL12 i hamować w ten sposób proliferację oraz promować apoptozę.

Obecnie rola mikrośrodowiska szpiku kostnego w ochronie i wspieraniu oporności na terapię w białaczce jest intensywnie badana. Dlatego też, wybrany przez Doktoranta temat pracy należy uznać za aktualny, intersujący i w pełni uzasadniony.

Przedstawiona do recenzji praca liczy 151 stron. Pracę uzupełniają zamieszczone na początku spis użytych w tekście skrótów, spis treści oraz umieszczone na końcu: spis tabel i rycin, streszczenie w języku polskim i angielskim oraz 328 pozycji piśmiennictwa. W opracowaniu umieszczono 23 ryciny i 21 tabel. Praca napisana jest poprawną polszczyzną, pod względem edytorskim jest wykonana staranie. Na pochwałę zasługuje fakt, że praca napisana jasnym, precyzyjnym językiem.

We wstępie Autor w wyczerpujący i jasny sposób, niezwykle rzetelnie przedstawił aktualny stan wiedzy w zakresie wybranego przez siebie tematu, skupiając się w nim, w szczególności na patomechanizmie rozwoju AML, diagnostyce choroby, kryteriach rozpoznania oraz leczenia pacjentów. W kolejnej części w bardzo szczegóły sposób Doktorant opisuje budowę i funkcję niższy hematopoetycznych oraz rolę mikrośrodowiska szpiku kostnego w rozwoju AML, z uwzględnieniem budowy i funkcji szlaków sygnałowych wybranych przez siebie białek. Tekst wstępu jest uzupełniony o 5 tabel i 17 rycin, co ułatwia czytelnikowi zrozumienie zagadnienia. Na szczególną uwagę zwraca niezwykle staranność oraz przejrzystość rycin, których autorem jest sam Doktorant. Swobodny sposób poruszania się w obszarze tego trudnego zagadnienia dowodzi dojrzałości naukowej Autora.

Doktorant przyjął następujące cele swojej pracy:

1. Ocena białaczkowych komórek macierzystych (LSC) i prawidłowych macierzystych komórek krwiotwórczych (HSC) w próbkach szpiku kostnego pacjentów z AML.
2. Oznaczenie i porównanie ekspresji receptorów białek niszy hematopoetycznej (BNH): Robo4, CXCR4, Notch1, Tie2, na powierzchni zarówno komórek macierzystych białaczkowych, jak i prawidłowych macierzystych krwiotwórczych.
3. Poszukiwanie zależności pomiędzy liczbą LSC oraz ekspresją receptorów poszczególnych BNH, a parametrami odzwierciedlającymi masę guza i znanymi czynnikami prognostycznymi.
4. Ocena ekspresji poszczególnych BNH na LSC, a całkowitym przeżyciem.

Do analizy włączono 54 chorych na AML, a materiał (szpik kostny) pobierano od pacjentów w momencie rozpoznania choroby. Pacjenci rekrutowani byli spośród chorych hospitalizowanych na Oddziale Hematologii Wojewódzkiego Wielospecjalistycznego Centrum Onkologii i Traumatologii/ Kliniki Hematologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi w okresie od 1 kwietnia 2019 do 12 grudnia 2021 roku. Autor uzyskał zgodę Komisji Bioetyczną nr RNN/16/18/KE na prowadzenie badania oraz uzyskał akceptację planowanego eksperymentu Rady Naukowej Katedry i Kliniki Hematologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi.

Opisana w sposób przejrzysty metodyka badania nie budzi zastrzeżeń. Autor szczegółowo opisuje techniki laboratoryjne przeprowadzonych badań oraz umieszcza w poszczególnych tabelach spis użytych przeciwciał do analizy cytometrycznej. Metody statystyczne wykorzystane w analizie zebranego materiału zostały dobrane prawidłowo i nie budzą zastrzeżeń.

Rozdział „Wyniki” jest bardzo szczegółowy i posiada charakter opisowy. Prawie każdy oceniany parametr jest przedstawiony w postaci tabeli lub ryciny, co bardzo ułatwia śledzenie tekstu i sposobu realizacji badań.

Autor wykazał, iż w badanej populacji chorych na AML, liczba białaczkowych komórek macierzystych była istotnie wyższa niż liczba prawidłowych komórek macierzystych hematopoetycznych. Doktorant wykazał również negatywny wpływ liczby komórek białaczkowych macierzystych na całkowite przeżycie pacjentów z AML w grupie pacjentów leczonych przy użyciu intensywnej chemioterapii, takiej zależności nie wykazano w grupie



pacjentów zakwalifikowanych do leczenia nieintensywnego. Jednocześnie Autor wykazał zwiększoną ekspresję Tie2 na białaczkowych komórkach macierzystych, w porównaniu do ekspresji na komórkach macierzystych hematopoetycznych, co jak wskazuje Autor może wskazywać, iż interakcja ANG-Tie2 jest jednym z istotnych mechanizmów odpowiedzialnych za utrzymywanie komórek białaczkowych macierzystych w uśpieniu. W dalszej części prac, Autor wykazał istotnie wyższą ekspresję białek CXCR4 na komórkach macierzystych, niż na komórkach hematopoetycznych macierzystych. Ponadto, wykazano, iż większe stężenie białka CXCR4 na komórkach białaczkowych korelowało z gorszym całkowitym przeżyciem, ale również tylko u pacjentów leczonych intensywną chemioterapią. Doktorat potwierdził również obecność ekspresji receptora Notch1 oraz ekspresji białek Robo4 na komórkach białaczkowych macierzystych. Ekspresja obu analizowanych białek była wyższa w porównaniu do ekspresji na komórkach macierzystych hematopoetycznych.

Uwagę recenzenta zwraca niejasne (brak wyjaśnienia w tekście czy rycinie), przyjęte do analizy całkowitego przeżycia, progi odcięcia dla poszczególnych analizowanych parametrów (np. próg 30 komórek LSC/ na milion). Należałoby dopisać na podstawie jakich analiz uzyskano te punkty odcięcia do dalszych analiz.

Podsumowanie pracy stanowi 5 uzasadnionych wniosków, wpływających z uzyskanych wyników badań, odpowiadających na założony cel badań.

### **Ocena końcowa**

Podsumowując stwierdzam, iż przedstawiona mi do oceny praca lek. Kamila Brzozowskiego charakteryzuje się trafnością wyboru tematu oraz stanowi wartościowy i oryginalny dorobek naukowy. Doktorant wykazał się umiejętnością wykorzystania dostępnej bibliografii oraz formułowania celów planowanych badań naukowych i wniosków z nich wypływających. Zawarta w rozprawie analiza tematu jest spójna i przyczynia się do lepszego poznania omawianej tematyki, toteż jest cennym uzupełnieniem dostępnego piśmiennictwa naukowego. Autor w pełni zrealizował zaplanowany cel, dobrze opanował niełatwy warsztat badawczy i wykazał się doskonale przygotowaniem merytorycznym. Rozprawa ma dużą wartość poznawczą i stanowi podstawę do kontynuowania badań naukowych w tej dziedzinie.

Wykonanie przez doktoranta ogromnej pracy badawczej o dużej wartości naukowej, a dodatkowo rzeczowa i krytyczna ocena uzyskanych własnych danych oraz wysoka staranność

opracowania statystycznych wyników, jak również szata graficzna upoważniają mnie do wystąpienia do Wysokiej Rady o przyznanie wyróżnienia za wybitną rozprawę doktorską.

Stwierdzam, że przedłożona do recenzji praca autorstwa lekarza Kamila Brzozowskiego spełnia wszystkie warunki określone w art. 13 ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2003 r. Nr 65, poz. 595 oraz art. 179 ust. 1 ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U z 2018r poz. 1669 z późn.zm). Tym samym zwracam się do Rady Dyscypliny Nauk Medycznych Uniwersytetu Medycznego w Łodzi o dopuszczenie lekarza Kamila Brzozowskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

dr hab. med. Łukasz Bołkun  
specjalista chorób wewnętrznych  
hematolog i transfuzjolog  
12293001

Dr hab. n. med. Łukasz Bołkun