



UNIwersytet Medyczny

IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH WE WROCLAWIU

Dr hab. n. med. Marta Sobas

Wrocław, 06 sierpnia 2024 r.

Klinika Hematologii, Nowotworów Krwi

i Transplantacji Szpiku

Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu

Recenzja

Rozprawy doktorskiej lek. Kamila Brzozowskiego

pt. „Ocena wybranych receptorów białek mikrośrodowiska szpiku kostnego na powierzchni białaczkowych komórek macierzystych (LSC) u chorych na ostrą białaczkę szpikową (AML)”

Na podstawie art. 187 Ustawy Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (t.j. Dz. U. z 2021 r. poz 478 ze zm.), przedkładam recenzję rozprawy doktorskiej lek. Kamila Brzozowskiego pt. „Ocena wybranych receptorów białek mikrośrodowiska szpiku kostnego na powierzchni białaczkowych komórek macierzystych (LSC) u chorych na ostrą białaczkę szpikową (AML)” przygotowanej pod kierownictwem naukowym prof. dr hab. n. med. Agnieszki Wierzbowskiej i dr n. med. Magdaleny Czemerskiej.

Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska to monografia zawierająca 151 stron maszynopisu i składająca się z następujących części: Wstęp, Założenia i cel pracy, Materiał i metody, Wyniki, Omówienie wyników i dyskusja, Wnioski, Streszczenie w języku polskim i w języku angielskim, Spis tabel i rycin, Piśmiennictwo (328 pozycji opublikowanych w latach 1993 –2023). Rozprawa doktorska koncentruje się na interakcji między LSC a HN, które mogą stanowić o oporności LSC na zastosowaną chemioterapię.

We wprowadzeniu Doktorant przybliży tematykę etiologii ostrej białaczki szpikowej (AML) z uwzględnieniem roli czynników środowiskowych, chorób wrodzonych, innych klonalnych chorób układu krwiotwórczego oraz predyspozycji genetycznych. Kolejny aspekt przybliżany przez Doktoranta to patogeneza AML. Doktorant przedstawia prawidłowy proces krwiotworzenia z udziałem macierzystych komórek hematopoetycznych (HSC), następnie omawia czym są białaczkowe komórki macierzyste (LSC) i opisuje model patogenetyczny AML. Kolejne strony wstępu Doktorant poświęca na przedstawienie obrazu klinicznego chorego z AML, klasyfikacji AML (z uwzględnieniem klasyfikacji WHO2016 i 2022 oraz ICC2022), czynnikom rokowniczym (ELN2017 i 2022) oraz terapii. Ostatnim poruszonym zagadnieniem jest struktura i rola mikrośrodowiska szpiku kostnego w biologii AML. Doktorant rzeczowo przedstawia mechanizm oddziaływania LSC z mikrośrodowiskiem szpiku, prezentuje wybrane układy ligand-receptor: Robo4-Slit2, CXCR4-SDF1, Notch-Jagged1, Tie2-Ang-1. Wstęp jest skonstruowany w sposób jasny i uporządkowany, dodatkowo dla większej przejrzystości tekstu, Doktorant wzbogacił go o tabele i figury. Cytowana literatura jest trafna i wskazuje na konieczność kontynuowania badań nad oddziaływaniem pomiędzy LSC i NH.

Cele i założenia pracy zostały jasno i przejrzysto sformułowane. Hipoteza badawcza to stwierdzenie, że interakcje pomiędzy LSC a HS wpływają na oporność na chemioterapię. Aby rozwinąć tę tezę badawczą, Doktorant zaplanował 4 cele pracy:

1. Ocena liczby LSC i prawidłowych HSC w próbkach szpiku kostnego chorych z nowo rozpoznaną AML
2. Oznaczenie i porównanie ekspresji receptorów białek niszy hematopoetycznej (BNH): Robo4, CXCR4, Notch1 i Tie2, na powierzchni LSC oraz na HSC za pomocą 10-kolorowej cytometrii przepływownej.
3. Poszukiwanie zależności pomiędzy liczbą LSC oraz ekspresją receptorów poszczególnych BNH, a parametrami odzwierciedlającymi masę guza białaczkowe i znacznymi czynnikami prognostycznymi.
4. Ocena zależności pomiędzy ekspresją poszczególnych BNH na LSC a całkowity przeżyciem.

Materiał i metody zostały opisane przejrzysto. Doktorant przeprowadził badanie jednośrodkowe, prospektywne. Jest to badanie wiążące elementy badania podstawowego i

kliniczno-kontrolnego. Doktorant uzyskał zgodę lokalnej komisji bioetycznej, numer zgody RNN/16/18/KE z dnia 15 lutego 2018 r., na prowadzenie badania oraz akceptację Rady Naukowej Katedry i Kliniki Hematologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi na przeprowadzenie zaplanowanego eksperymentu. Badanie było finansowane z pieniędzy statutowych przeznaczonych na działalność naukową Katedry i Kliniki Hematologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi oraz w ramach finansowania badań młodych pracowników nauki i doktorantów Uniwersytetu Medycznego w Łodzi (nr zadania badawczego: 502-03/1-093-01/502-14-359-18). Do badania włączani byli pacjenci powyżej 18 roku życia z nowo rozpoznaną AML, z wykluczeniem ostrej białaczki promielocytowej. Doktorant krótko scharakteryzował populację zakwalifikowaną do badania, omówił zastosowane schematy lecznicze oraz kryteria odpowiedzi, jasno opisał procedurę pobierania krwi i szpiku, przybliżył analizę immunofenotypową szpiku, przedstawił zastosowany panel przeciwciał oraz zapoznał czytelnika ze strategią bramkowania LSC i HSC oraz białek Robo4, CXCR4, Notch1 i Tie2. Sposób przedstawienia analizy immunofenotypowej wskazuje na fakt posiadania dużej wiedzy na ten temat. Analiza statystyczna została przeprowadzona prawidłowo.

W wynikach Doktorant przedstawił bardzo ciekawe i nowatorskie obserwacje:

1. Doktorant sugeruje, że w szpiku istnieje ograniczona liczba komórek podścieliska, a LSC i HSC konkurują o nisze hematopoetyczną. Dlatego u chorych z AML występuje przewaga komórek LSC nad HSC. Dotychczas nie opublikowano danych na temat zależności pomiędzy LSC i HSC w chwili rozpoznania.
2. Ilościowa ocena LSC może pomóc w szybkiej identyfikacji chorych z AML o niekorzystnym rokowaniu.
3. Wyniki analizy sugerują zwiększoną zależność LSC od interakcji z mikrośrodowiskiem szpiku w porównaniu do prawidłowych HSC (wyższa ekspresja Notch1 oraz Tie2 na LSC w porównaniu do prawidłowych HSC). Warto podkreślić, że Doktorant jako pierwszy zaobserwował zwiększoną ekspresję Tie2 na LSC.
4. Zwiększona ekspresja CXCR4 na LSC wiąże się z gorszym rokowaniem i krótszym czasem przeżycia co sugeruje wiodącą rolę szlaku CXCR4-CXCL12 w oddziaływaniu pomiędzy mikrośrodowiskiem szpiku a LSC. Dotychczas nie opublikowano prac wykazujących ekspresję CXCR4 na powierzchni LSC (dostępne są tylko prace na temat ekspresji CXCR4 na powierzchni HSC).

5. Doktorant jako pierwszy stwierdził wyższą ekspresję Robo4 na HSCT niż na LSC i zasugerował, że interakcja Robo4-Slit2 jest raczej cechą prawidłowej hematopoezy.

Poniżej przedstawię uwagi, które nasunęły się podczas lektury rozprawy doktorskiej lek. Kamila Brzozowskiego:

1. Grupa badana jest mała (łącznie 54 chorych) i dość heterogenna (chorzy różnicowani wiekowo, różne schematy leczenia: terapia intensywna (DA vs DAC) i nieintensywna (azacytydyna, niskie dawki cytarabiny, hydroksymocznik, brak terapii). Poza tym, grupa badana powinna być nieco lepiej opisana:
 - brak danych na temat klasyfikacji AML wg WHO2016. Czy w grupie badanej występowali chorzy z AML związaną ze zmianami mielodysplastycznymi lub zależną od terapii (tzw. wtórna AML)
 - u ilu chorych stwierdzono mutację *FLT3-ITD* (Doktorant wspomina o wpływie kladrybiny na wyniki leczenia AML *FLT3-ITD* oraz o zależnościach między białkami Tie2 i FLT3)
 - czy i u ilu chorych wykonano allogeniczne przeszczepienie hematopoetycznych komórek macierzystych (alloHSCT)
 - słaba charakterystyka (w tym genetyczna) grupy leczonej „nieintensywnie” (niezależne od Doktoranta)
2. We wstępie, brak informacji na temat terapii „nieintensywnej”. Do grupy leczonej „nieintensywnie” zaliczono chorych leczonych azacytydyną (AZA) w monoterapii i niskimi dawkami cytarabiny, ale także pacjentów u których zastosowano terapię paliatywną lub brak terapii. Obecnym standardem postępowania w AML niekwalifikującej się do chemioterapii intensywnej jest schemat AZA plus wenetoklaks (VEN). Dlatego uważam, że nie można odnosić tych wyników do populacji AML leczonej standardowym „nieintensywnym” schematem.
3. Kilka drobnych błędów edytorskich.

W przyszłości ciekawa by była analiza ilości LSC przed i po terapii AML:

- u chorych leczonych schematami DA vs DAC (efekt kladrybiny?)
- u chorych opornych na zastosowaną indukcję
- u chorych przed i po alloHSCT (czy ilość LSC pomoże we wczesnej identyfikacji wznowy?)

Powyższe uwagi, nie umniejszają rangi przedstawionej mi do oceny rozprawy doktorskiej lek. Kamila Brzozowskiego. Doktorant w podsumowaniu dyskusji stwierdził, że będzie kontynuował pracę nad tematem i mam nadzieję, że moje komentarze pomogą mu w dalszej analizie tematu.

Reasumując: uważam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska w postaci monografii porusza aktualne i ważne kwestie dotyczące oporności AML na zastosowaną terapię. Doktorant, wykazując się dużą znajomością tematyki, dokonuje szeroko zakrojonej analizy wyników własnych, zestawiając je z uprzednio opublikowanymi badaniami. Jest świadomy ograniczeń przeprowadzonej analizy i wskazuje na konieczność dalszych badań na większej i lepiej sprecyzowanej grupie chorych. Przedstawiona mi do oceny dysertacja stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, dowodzi posiadania wiedzy teoretycznej w dyscyplinie nauki medycznej oraz umiejętności samodzielnego prowadzenia pracy naukowej, spełniając w pełni formalne i merytoryczne warunki stawiane rozprawom doktorskim, określone w art. 13 ust. 1 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. z 2017 r. poz. 1789 ze zm.) w związku z art. 179 ust. 1 Ustawy z dnia 3 lipca 2018 roku przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1669 ze zm.). Na tej podstawie wnioskuję o dopuszczenie lek. Kamila Brzozowskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie chciałam zawnioskować o wyróżnienie przedstawionej mi do recenzji rozprawy doktorskiej.

Z poważaniem


dr hab.n.med. Marta Sobas
Specjalista Hematolog
2592310

