

Recenzja

Rozprawy na stopień naukowy doktora nauk medycznych

w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu

w dyscyplinie nauki medyczne

mgr Ewy Dobak

„Ocena cytometryczna komórek o immunofenotypie CD34+CD38- CLL-1+ w szpiku kostnym u pacjentów z rozpoznaniem ostrej białaczki szpikowej i zespołu mielodysplastycznego”

Ostre białaczki szpikowe (ang. *acute myeloblastic leukemias*; AML) oraz zespoły mielodysplastyczne (ang. *myelodysplastic syndromes*; MDS) są klonalnymi rozrostami nowotworowymi układu krwiotwórczego. AML wywodzą się z wczesnej prekursorowej komórki mieloidalnej, która ulega transformacji w wyniku mutacji DNA, co prowadzi do niekontrolowanych podziałów, a w efekcie do kumulacji niedojrzałych, dysfunkcyjnych komórek blastycznych. MDS to grupa chorób klonalnych, która charakteryzuje się defektem hematopoetycznej komórki macierzystej (ang. *hematopoietic stem cell*; HSC), uniemożliwiającym różnicowanie i dojrzewanie komórek krwiotwórczych szpiku. Prowadzi to w efekcie do dysplazji szpiku z jedno-, dwu- lub trójliniową cytopenią na obwodzie oraz najczęściej z bogatokomórkowym szpikiem. Leczenie zarówno AML jak i MDS jest wciąż problemem u większości chorych, a allotransplantacja komórek macierzystych szpiku jest wciąż podstawową opcją dającą największe szanse na wyleczenie. W ostatnich latach prowadzone są liczne badania nad nowymi strategiami leczenia celowanego/biologicznego w tych schorzeniach, jednak problem ten wciąż stanowi wyzwanie dla współczesnej onkohematologii.

Praca doktorska mgr Ewy Dobak dotyczy niezwykle ważnego problemu poszukiwania nowych, specyficznych czynników prognostycznych oraz potencjalnych celów terapii biologicznej w nowotworach układu krwiotwórczego, w tym w rozrostach mieloidalnych. Przedmiotem badań Doktorantki była ekspresja cząsteczki CCL-1 (*C-type leptin-like molecule-1*) na komórkach CD34+CD38- szpiku kostnego w ostrych białaczkach szpikowych (AML) i zespołach mielodysplastycznych oraz znaczenie prognostyczne oceny liczby i różnych parametrów cytometrycznych komórek CD34+CD38-CLL-1+ w tych chorobach.

Przestawiona mi do oceny praca ma układ typowy dla rozpraw doktorskich. Liczy ogółem 123 strony maszynopisu i zawiera 131 pozycji piśmiennictwa. Jest napisana rzeczowym,

poprawnym językiem. Opis wyników uzupełniony jest przejrzysto wykonanymi 77 rycinami oraz 80 tabelami.

Tekst rozprawy poprzedzony jest dwoma tabelami: obszerną tabelą zastosowanych skrótów oraz, co jest bardzo cenne dla lepszej czytelności i przejrzystości przedstawionych w dalszej części wyników, tabelą zawierającą algorytmy zastosowanych w pracy obliczeń.

We Wstępie, Doktorantka przedstawiła w sposób syntetyczny definicje, klasyfikacje oraz systemy prognostyczne stosowane w AML i MDS (w tym miejscu proponuję w tytułach podrozdziałów umieścić te rozpoznania w liczbach mnogich, tzn. „Ostre białaczki szpikowe” i „Zespoły mielodysplastyczne”). Kolejną częścią Wstępu jest omówienie wiedzy na temat cząsteczki CLL-1 (1.3), a następnie przedstawienie aktualnych doświadczeń na temat oceny minimalnej choroby resztkowej w AML (1.4). Ten ostatni podrozdział mógłby być moim zdaniem umieszczony w części poświęconej AML (1.1), a opisana w dalszym ciągu narracji metoda cytometrycznej identyfikacji białczkowych komórek macierzystych w szpiku (ang. *leukemic stem cells*, LSC) powinna być umieszczona w podrozdziale na temat CLL-1 (1.3). Podrozdział „Leczenie celowane anty-CLL-1” kończy Wstęp; w związku z powyższymi uwagami, jeżeli Autorka zgodzi się je uwzględnić, proponuję zmienić numerację tego podrozdziału na 1.4.

Podsumowując ten fragment rozprawy mam pewien niedosyt odnośnie rozwinięcia podjętych wątków. Wstęp potraktowany jest zbyt ogólnikowo, nieproporcjonalnie krótko do następnych części pracy. Odnośnie opisu samego CLL-1 myślę, że byłby tu pomocny schemat obrazujący graficznie strukturę oraz mechanizmy działania tej cząsteczki. Brakuje mi także ogólnego wprowadzenia do tematyki badań - w formie osobnego, poprzedzającego podrozdziału „Wprowadzenie”.

Celami jakie postawiła sobie Autorka były identyfikacja i ocena parametrów cytometrycznych mogących służyć do monitorowania komórek o immunofenotypie CD34+CD38-CLL-1+ w szpiku kostnym chorych na AML lub MDS oraz zbadanie ich związku z wybranymi danymi morfologiczno-klinicznymi oraz rokowaniem.

Dobór i charakterystyka grupy badanej przedstawione w rozdziale Materiał i Metody nie budzą zastrzeżeń, liczba przebadanych chorych nie była jednak bardzo wysoka (52 pacjentów), co w kontekście ich podziału na mniejsze podgrupy wymaga ostrożnej interpretacji wyników analiz statystycznych. Wyróżniono grupę 27 nieleczonych wcześniej chorych na AML, grupę 5 pacjentów w całkowitej remisji po leczeniu (AML-CR) oraz grupę 20 chorych na MDS, dzieląc je następnie na dalsze specyficzne podgrupy. Grupę kontrolną stanowiło 13 pacjentów, u których wykonano diagnostyczną punkcję szpiku kostnego, ale wykluczono rozpoznanie AML czy MDS. Baza

danych kliniczno-patologicznych została moim zdaniem opracowana wyczerpująco i przedstawiona rzetelnie w czytelnych tabelach.

Metodyka badań opiera się na analizie różnych parametrów ekspresji cząsteczki CLL-1 na LSC (komórki CD34+/CD38-) oraz liczby komórek CD34+/CD38-/CLL-1+ w szpiku pacjentów z AML i MDS; należy podkreślić, że ekspresji tego białka nie stwierdza się na prawidłowych komórkach macierzystych szpiku (HSC). Badania przeprowadzono wykorzystując szerokie możliwości cytometrii przepływowej. Do ocenianych parametrów cytometrycznych należały średnia intensywność fluorescencji (ang. *mean fluorescence intensity*, MFI), wielkość komórek CD34+/CD38-/CLL-1+ (ang. *forward scatter*, FSC) oraz ich ziarnistość (ang. *side scatter*, SSC) w korelacji z liczbą/procentem wszystkich komórek CD34+ (*total*), komórek CD34+/CD38- (blastów) oraz komórek z ekspresją CLL-1 (CD34+/CD38-/CLL-1+). Należy podkreślić, że ten fragment rozprawy został opracowany szczegółowo i rzetelnie, wskazując na dużą wiedzę i pełne opanowanie metod laboratoryjnych, w tym cytometrycznych, stosowanych przez Doktorantkę. Odnosi się to także wyboru i zastosowania adekwatnych metod statystycznych.

Wyniki: Ta część pracy jest niezwykle obszerna, a jej dokładna analiza jest wyzwaniem ze względu na szczegółowość i poziom skomplikowania omówienia oraz dokumentacji uzyskanych wyników. W efekcie swoich badań Autorka znalazła między innymi wyższy odsetek komórek LSC szpiku wykazujących ekspresję CLL-1 u chorych na AML w porównaniu z MDS. U pacjentów z AML z dobrą odpowiedzią na zastosowane leczenie liczba tych komórek w biopatach szpiku spadała systematycznie do poziomu zerowego po uzyskaniu remisji. Ocena bezwzględnej liczby komórek CD34+/CD38-/CLL-1+ w przeliczaniu na 1 μ l szpiku okazała się istotna dla oceny głębokości remisji w AML, a przydatna w ocenie ryzyka transformacji w AML u pacjentów z MDS. U chorych z rozpoznaniem zarówno AML jak i MDS nie było związku z wiekiem, płcią czy typem morfologicznym choroby.

Mam w tym miejscu ogólną uwagę: w rozdziale Wyniki, po opisie każdej ich części Autorka dokonuje jej podsumowania w formie poszczególnych „wniosków”. Ten rozdział nie jest na to właściwym miejscem, proponuję powyższe fragmenty wykorzystać w odpowiednich częściach Dyskusji. Ponadto, stworzony przez Autorkę rozdział „Podsumowanie wyników”, który dla czytelnika stanowi pewne ułatwienie w zrozumieniu całości wykonanych analiz, jest praktycznie powtórzeniem powyższych „wniosków”.

Pozostawiam do przemyślenia, czy podanego na końcu „Wyników” opisu dwóch pacjentów, które są przypadkami wyjętymi z kontekstu analizy statystycznej - chociaż stanowiącymi dobre zobrazowanie tendencji obserwowanych w poszczególnych podgrupach - nie wykorzystać raczej w rozdziale „Dyskusja”. Pozostawiam to Autorce do rozważenia.

W kolejnym rozdziale Doktorantka podjęła dyskusję konfrontując wyniki swojej pracy z doniesieniami z innych, przeprowadzonych dotąd badań. Zrobiła to w oparciu o dobrze dobrane piśmiennictwo, wykazując wystarczającą wiedzę w temacie. Dla lepszego ukierunkowania tej dyskusji rozpocząłbym jednak ten rozdział od syntetycznego podsumowania uzyskanych wyników własnych. Jednocześnie istotne byłoby podkreślenie co nowego wnoszą przeprowadzone przez Autorkę badania.

Rozprawę kończą cztery wnioski, które niestety nie są dokładnym odbiciem postanowionych celów i nie wynikają do końca z przedstawionych wyników badań własnych Doktorantki. Są one zbyt ogólnikowe lub stanowią powtórzenie opisanych wyników. Z pewnością ta część pracy wymaga korekty przed przyszłą publikacją.

Z obowiązku recenzenta muszę stwierdzić, że w rozprawie znalazły się niejasne czy nieprecyzyjne sformułowania, których szczegółowo nie przytaczam w niniejszej recenzji (wykracza to poza jej zakres), wskazując je bezpośrednio w manuskrypcie. Dotyczy to także pewnych drobniejszych potknięć czy usterek (głównie stylistycznych lub interpunkcyjnych) czy braku konsekwencji w stosowaniu niektórych skrótów. Powyższych niedociągnięć nie sposób całkowicie uniknąć w pracy o takim formacie, pozwoliłem sobie zaznaczyć je w tekście otrzymanego manuskryptu. Dotyczy to całej rozprawy i wymaga szeregu korekt w czasie przygotowania do przyszłej publikacji. Uważnej korekty wymaga też Streszczenie pracy.

Ponadto, przeglądając załączoną do pracy dokumentację stwierdziłem, że w zgodą Komisji Bioetycznej z dnia 18.12.2017 roku na prowadzenie badań zakładała promotora pracy w osobie Pani Prof. dr hab. n. med. Elżbiety Urańskiej - nie znalazłem aneksu czy innego dokumentu dotyczącego zmiany promotora.

Pragnę podkreślić, że powyższe uwagi to roboczy i koleżeński rodzaj pomocy w jak najlepszym opublikowaniu wyników, do której czuje się zobowiązany z powodu moich naukowych doświadczeń. Nie zmieniają one mojej generalnie pozytywnej oceny rozprawy Pani mgr Ewy Dobak i podziwu dla jej pracy wniesionej w przeprowadzenie badań. Rozprawa stanowi samodzielne rozwiązanie problemu, pomimo, że oparta jest zasadniczo na badaniu pojedynczej cząsteczki jako potencjalnego czynnika prognostycznego w AML oraz MDS. Wyniki przeprowadzonych badań stanowią niewątpliwie dodatkowy wkład w dziedzinę badań nad biologią AML i MDS oraz nowymi strategiami prognozowania w tych schorzeniach. Doktorantka bardzo dobrze opanowała zastosowane przez siebie metody laboratoryjne, a z punktu widzenia osoby zaangażowanej w badania nad rozwojem technik cytometrycznych stwierdzam, że umiejętne wykorzystanie tej metodyki przez Autorkę zasługuje na określenie.

W mojej opinii przedstawiona mi do oceny praca spełnia wymogi stawiane rozprawie na stopień naukowy doktora nauk medycznych. Pozytywna ogólna ocena aspektu merytorycznego pracy doktorskiej mgr Ewy Dobak pozwala mi skierować wniosek do Wysokiej Rady Naukowej Dyscypliny Medyczne Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie o dopuszczenie Pani mgr Ewy Dobak do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

UNIwersYTET MEDYCZNY w ŁÓDZI
ZAKŁAD HEMATOLOGII DOŚWIADCZALNEJ
KATEDRY HEMATOLOGII
93-516 Łódź, ul. Ciołkowskiego 2
tel. 042-689-51-91, fax 042-689-51-92

Z poważaniem,

KIEROWNIK
Zakładu Hematologii Doświadczalnej
Katedry Hematologii
Uniwersytetu Medycznego w Łodzi


Prof. dr hab. n. med. Piotr Siołkowski

