



15-230 Białystok  
ul. Mickiewicza 2A  
skr. pocztowa 15

UNIWERSYTET MEDYCZNY  
W BIAŁYMSTOKU  
ZAKŁAD ANATOMII PRAWIDŁOWEJ CZŁOWIEKA

Kierownik: Prof. dr hab. Janusz Dzieciot



tel. (+48) 85 748 5661  
tel/fax. (+48) 85 748 5664  
e-mail: [anatomia@umb.edu.pl](mailto:anatomia@umb.edu.pl)

Białystok, 28.02.2023r.

## OCENA

rozprawy doktorskiej magister Ewy Dobak

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

Uchwałą Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Medyczne Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie została mi powierzona ocena rozprawy doktorskiej magister Ewy Dobak, przeprowadzonej pod kierunkiem dr hab. n. med. Katarzyny Karpińskiej-Łukaszewicz.

Nowotwory układu krwiotwórczego, w szczególności ostre białaczki, należą do chorób o bardzo szybkim przebiegu klinicznym. Dlatego też ich diagnostyka wymaga szczególnego zaangażowania wysoko wykwalifikowanego personelu medycznego i szybkiego postępowania. Jest to możliwe w ośrodkach specjalistycznych dysponujących odpowiednio wyszkoloną kadrą i sprzętem. Pełna diagnostyka u chorych z podejrzeniem ostrej białaczki opiera się na badaniach krwi i szpiku kostnego. Kompleksowa ocena aspiratu szpiku kostnego obejmuje standardową ocenę cytologiczną - morfologię, badania cytogenetyczne, określające zaburzenia ilości i struktury chromosomów oraz badania molekularne mające na celu stwierdzenie występowania lub braku obecności zaburzeń w genach komórek szpikowych.

Najbardziej obiektywnym badaniem w diagnostyce chorób mieloproliferacyjnych jest fluorescencyjna cytometria przepływowa, umożliwiająca immunofenotypowanie komórek szpiku. Umożliwia ona także monitorowanie skuteczności prowadzonej terapii i ocenę minimalnej choroby resztkowej. Ma to

szczególne znaczenie w terapii spersonalizowanej wykorzystywanej u pacjentów z chorobami mieloproliferacyjnymi.

Mgr Ewa Dobak swoje badania przeprowadziła w oparciu o retrospektywny materiał Zakładu Patomorfologii SPSK1 PUM w Szczecinie. Na prowadzenie badań uzyskała zgodę Komitetu ds. Etyki Badań w PUM (z dnia 18.12.2017 roku).

Doktorantka przeprowadziła ocenę cytometryczną komórek o immunofenotypie CD34+CD38-CLL-1+ w szpiku kostnym u pacjentów z ostrą białaczką szpikową i zespołem mielodysplastycznym. Dobór pacjentów miał istotne znaczenie kliniczne w związku z częstą transformacją zespołu mielodysplastycznego w ostrą białaczkę szpikową.

We wstępie dysertacji mgr Ewa Dobak w zwięzłej formie przedstawiła charakterystykę ostrej białaczki szpikowej uwzględniającą klasyfikacje z 2016 roku i 2022 roku. Wskazała na rolę komórek LSC występujących w niszy szpikowej. Analogiczne informacje, obejmujące także dane epidemiologiczne, przedstawiła w opisie zespołu mielodysplastycznego. Szczegółowo scharakteryzowała cząsteczkę CLL-1 z uwzględnieniem jej postaci immunofenotypowych i znaczenia klinicznego. Stwierdziła, że pomimo prowadzenia wielu badań, budowa i funkcja CLL-1 nie zostały jednoznacznie wyjaśnione. Wskazała na wykorzystywane techniki wykrywania minimalnej choroby resztkowej, co ma istotne znaczenie przy ocenie skuteczności prowadzonej terapii u chorych z AML. Przedstawiła zarówno techniki molekularne jak i metodę immunofenotypowania, wskazując na zastosowanie wieloparametrowej cytometrii przepływownej u ponad 90% chorych z AML. Wskazała także na celowość zastosowania tej metody do wykrywania komórek LSC o immunofenotypie CD34+CD38-CLL-1+. Przedstawiła możliwości wykorzystania terapeutycznego przeciwciał w leczeniu celowanym anty-CLL-1 na komórkach AML. Opisała dotychczasowe próby leczenia i trudności terapeutyczne wynikające ze zróżnicowania grupy pacjentów z AML i MDS, co warunkuje ograniczenie efektów u chorych z AML i progresję MDS w AML.

Uważam, że postawiony przez Doktorantkę cel określenia parametrów wykorzystywanych do monitorowania komórek CD34+CD38-CLL-1+ oraz wykazanie związku tych komórek z wybranymi parametrami morfologiczno-klinicznymi

i rokowaniem u chorych z AML i MDS może mieć istotne znaczenie dla pacjentów z tymi chorobami. Szczególnie, że nawet stwierdzony niewielki odsetek tych komórek może poprzedzać rozwój choroby w AML.

Mgr Ewa Dobak swoje badania przeprowadziła w grupie 52 pacjentów, wśród których było 27 pacjentów z AML de novo, 5 pacjentów z AML w okresie całkowitej remisji oraz 20 pacjentów z MDS. Grupę porównawczą stanowiło 13 pacjentów, którym wykluczono MDS i AML z wyjątkiem dwóch pacjentów z populacją komórek o fenotypie CD34+ poniżej 1%. W rozdziale „Materiał i Metody” Doktorantka szczegółowo przedstawiła charakterystykę grup w zwięzłej formie opisowej i tabelarycznej. W rozdziale tym opisała także sposób obliczania liczby WBC oraz przebieg konfiguracji cytometru. W kolejnych częściach szczegółowo opisała procedurę barwienia w oparciu o czteroprobówkowy panel przeciwciał skoniugowanych z ośmioma różnymi fluorochromami.. Przedstawiła sposób obliczania wartości MFI względem antygenu CLL-1. Szczegółowo opisała sposób bramkowania komórek o immunofenotypie CD34+CD38-CLL-1+, który to opis uzupełniła reprezentatywnymi rycinami. Analizę statystyczną Doktorantka przeprowadziła w oparciu o właściwie dobrane testy statystyczne.

Uzyskane wyniki dla poszczególnych analizowanych grup zostały przedstawione w bardzo przejrzystej formie obejmującej krótkie opisy i prezentacje tabelaryczne. Dodatkową wartością takiej formy ich przedstawienia jest podsumowanie uzyskanych wyników zwięzłym wnioskiem. Dotyczy to wszystkich analiz w poszczególnych grupach obejmujących ocenę zależności między innymi pomiędzy komórkami o fenotypie CD34+CD38-CLL-1+ a wiekiem i płcią pacjentów, całej populacji komórek szpiku kostnego, blastów CD34+, MFI, oceną rokowania. Doktoranta poddała także szczegółowej analizie identyfikację komórek niszy szpikowej CD34+CD38- w odniesieniu między innymi do całej populacji komórek szpiku kostnego, blastów CD34+, a także rokowania u chorych z AML i MDS. Zidentyfikowała także komórki progenitorowe CD34+CD38+CLL-1+ w odniesieniu do blastów CD34+. Porównała ziarnistości i wielkość komórek CD34+CD38-CLL-1+ względem komórek CD34+CD38-CLL-1-. Analogiczną ocenę przeprowadziła w grupie pacjentów z AML, którzy osiągnęli całkowitą remisję.

Dodatkową wartością pracy jest przedstawienie wybranych trzech przypadków, w których praktycznie wykorzystane zostały oceniane w pracy parametry cytometryczne. Ma to istotne znaczenie przy stwierdzeniu złego rokowania, pomimo braku objawów morfologicznych choroby u chorych z AML i ocenie prawdopodobieństwa transformacji MDS do AML. Przed przestaniem pracy do publikacji proponuję zmienić w tekście nazwy osi na tradycyjne – oś X jako poziomą a oś Y jako pionową.

Przedstawienie w zwięzłej formie podsumowanych wyników ułatwia czytającemu zrozumienie wykazanych zależności, których opracowanie wymagało od Doktorantki ogromnego nakładu pracy.

Uzyskane wyniki wskazują na bardzo dobrą znajomość przez Doktorantkę badanego zagadnienia. Potwierdza to także przedstawiona w pracy dyskusja. Została ona napisana w bardzo interesującej formie, z wykorzystaniem właściwie dobranego piśmiennictwa, które obejmuje zarówno publikacje z ostatnich lat jak i zasadnicze pozycje z lat wcześniejszych. Proponuję przed publikacją pracy uzupełnić pozycję 114 piśmiennictwa.

W oparciu o przeprowadzoną analizę Doktorantka sformułowała wnioski, wskazujące na istotne znaczenie kliniczne oceny odsetka komórek CD34+CD38-CLL-1+ w diagnostyce AML i MDS, oceny ryzyka wystąpienia nawrotu choroby AML, monitorowania MRD, czy też transformacji MDS w AML.

Doktorantka w swojej pracy wykazała się gruntowną znajomością tematu i umiejętnością rozwiązywania zadania badawczego, co jest szczególnie istotne przy prowadzeniu badań z wykorzystaniem metod cytometrycznych, do analizy których niezbędna jest wiedza kliniczna.

Stwierdzam, że rozprawa doktorska magister Ewy Dobak „Ocena cytometryczna komórek o immunofenotypie CD34+CD38-CLL-1+ w szpiku kostnym u pacjentów z rozpoznaniem ostrej białaczki szpikowej i zespołu mielodysplastycznego” spełnia warunki określone w przepisach o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki.

Mam zaszczyt przedstawić Radzie Naukowej Dyscypliny Nauki Medyczne wniosek o dopuszczenie magister Ewy Dobak do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Uważam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska stanowi swoistą pozycję edukacyjną uwzględniającą niezwykle istotny aspekt kliniczny i w związku z tym zwracam się do Wysokiej Rady o wyróżnienie pracy.

Prof. dr hab. n. med. Janusz Dzięcioł

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Janusz Dzięcioł', written in a cursive style.