

Katedra Patomorfologii i Medycyny Sądowej, Wydział Lekarski;
Uniwersytet Warmińsko Mazurski w Olsztynie.

Kierownik Katedry Patomorfologii i Medycyny Sądowej;
Dr hab.n.med. Konrad Ptaszyński, Profesor UWM

Olsztyn, dn.26 maja 2023 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Ewy Dobak pt.: „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 myeloid leukemias*, AML) to grupa chorób wynikająca z klonalnego rozrostu w szpiku kostnym wczesnych komórek prekursorowych krwi. U jej podstaw leży klonalna proliferacja i nagromadzenie się w organizmie niedojrzałych komórek blastycznych wywodzących się ze stransformowanej komórki hematopoetycznej. Zespoły mielodysplastyczne (ang. *myelodysplastic syndromes*, MDS) są klonalnymi zaburzeniami hematopoetycznej komórki macierzystej uniemożliwiającymi różnicowanie i dojrzewanie komórek, przejawiające się jedno-, dwu- lub trójliniową cytopenią i najczęściej bogatokomórkowym szpikiem. Jest to grupa blisko związanych jednostek chorobowych, w których proces tworzenia krwinek jest zakłócony przez niezdolność niedojrzałych komórek do prawidłowego wzrostu i rozwoju.

Zarówno w AML jak i w MDS wykrywa się obecność białaczkowych komórek macierzystych (*leukemic stem cells*; LSC), które mają zdolność do samo odnawiania się, proliferacji i różnicowania w bardziej dojrzałe komórki o charakterze nowotworowym. W wyniku namnażania się komórek LSC, w AML, dochodzi do nagromadzenia niedojrzałych morfologicznie i czynnościowo komórek białaczkowych. Obecność komórek złośliwych tj. LSC, u pacjentów z MDS, stwarza natomiast zwiększone ryzyko progresji choroby do AML.

Ostra białaczka szpikowa jest najczęstszym nowotworem hematologicznym u dorosłych pacjentów, u których większość ma złe rokowanie. Pięcioletnie przeżycie pacjentów z nawrotową AML, oporną na leczenie lub niekorzystnymi czynnikami rokowniczymi wynosi około 30%. Pomimo znacznych postępów w dziedzinie leczenia przeciwnowotworowego i przełomów w immunoterapii nadal allotransplantacja komórek macierzystych szpiku daje największe szanse na wyleczenie AML. Istnieje pilna potrzeba opracowania nowych metod leczenia i rokowania w tej śmiertelnej chorobie. Ukierunkowana terapia skierowana przeciwko rzadkim białaczkowym komórkom LSC jest obiecującą perspektywą poprawy wyników leczenia pacjentów z AML. Dlatego niezwykle istotne jest odróżnienie komórek LSC od prawidłowych komórek hematopoetycznych w szpiku kostnym.

Mgr Ewa Dobak postanowiła identyfikować w pracy doktorskiej komórki złośliwe LSC i monitorować je podczas badań kontrolnych szpiku kostnego, u pacjentów z AML lub MDS. Doktorantka udowadnia, że obecność komórek LSC w badaniach choroby resztkowej (ang. *minimal residual disease*; MRD) ma wpływ prognostyczny w procesie leczenia. Komórki LSC identyfikuje metodą cytometrii przepływowej w przedziale komórek niszy szpikowej CD34+CD38⁻. Do dyskryminacji LSC od HSC (ang. *hematopoietic stem cells*) w przedziale komórek CD34+CD38⁻ wykorzystwała marker CLL-1 (ang. *c-type lectin-like molecule 1*; CLL-1). Białko CLL-1 jest specyficzne dla komórek LSC i jednocześnie nie stwierdza się go na prawidłowych komórkach regenerujących w szpiku kostnym w przedziale komórek CD34+CD38⁻.

Przedstawiona mi do recenzji praca ma układ typowy i składa się z 128 stron formatu A4 zawierających wstęp, cele pracy, materiał i metody, wyniki, dyskusję, wnioski, streszczenie, 131 pozycji piśmiennictwa oraz spis treści, streszczenia w języku polskim i angielskim oraz zgodę komisji bioetycznej. Opis wyników uzupełniony jest 77 rycinami i 80 tabelami. Tekst rozprawy poprzedzony jest tabelą objaśniającą zastosowane skróty oraz tabelą objaśniającą algorytmy zastosowanych obliczeń.

Pracę rozpoczyna zgrabnie napisany wstęp zawierający ogólne wiadomości na temat ostrych białaczek szpikowych oraz zespołów mielodysplastycznych. Doktorantka w sposób syntetyczny przedstawiła definicje, klasyfikacje oraz systemy prognostyczne w obu jednostkach chorobowych. W dalszej części wstępu scharakteryzowała cząsteczkę CLL-1 opisując jej miejsce występowania; wskazała na złośliwą naturę populacji komórek CLL-1⁺ w przedziale komórek niszy szpikowej CD34+CD38⁻. Kandydatka wskazała na możliwość monitorowania omawianych komórek CD34+CD38-CLL-1⁺ podczas badań MRD za pomocą aktualnych technik tj. PCR (ang. *polymerase chain reaction*; PCR) czy immunofenotypowanie komórek metodą cytometrii przepływowej. Rozdział kończy się omówieniem nowatorskich terapii celowanych skierowanych na komórki zawierające CLL-1. Wstęp jest napisany klarownie i stanowi właściwe wprowadzenie do dalszych części rozprawy doktorskiej. Autorka wymieniła jasno postawione cele pracy, którymi były identyfikacja i ocena parametrów cytometrycznych mogących służyć do monitorowania komórek o immunofenotypie CD34+CD38-CLL-1⁺ w szpiku kostnym u pacjentów z AML i MDS oraz zbadanie ich związku z wybranymi parametrami morfologiczno – klinicznymi oraz rokowaniem. W rozdziale materiały i metody doktorantka rzetelnie scharakteryzowała grupę badaną w zwartej formie opisowej i tabelarycznej. Grupę badaną stanowiło 52 pacjentów, wśród których wyróżniono: 27 pacjentów z nowo rozpoznany AML, 5 pacjentów będących w całkowitej remisji (będących po leczeniu AML) oraz 20 pacjentów z MDS. Za grupę kontrolną posłużyło 13 pacjentów, wśród których u 11 pacjentów wykluczono obecność AML i MDS oraz 2 pacjentów z rozpoznany AML, ale u których populacja komórek CD34⁺ stanowiła mniej niż 1%. Autorka wskazuje na zasadność podłączenia pacjentów z AML z CD34⁺ na poziomie niższym niż 1% do grupy kontrolnej powołując się na literaturę, która to, wskazuje na nienowotworowe pochodzenie tych komórek w AML z CD34⁺; 1%.

Biorąc pod uwagę zróżnicowanie grupy badanej na mniejsze podgrupy należy być ostrożnym w interpretacji uzyskanych wyników. Było to jednak badanie prospektywne przewidziane na okres dwóch lat (2018 - 2020) w efekcie czego doktorantka nie była w stanie przewidzieć ilości ani podtypów nowotworu badanych pacjentów. Autorka dokładnie opisała zastosowaną przez siebie metodę identyfikacji komórek CD34+CD38-CLL-1+ w cytometrii przepływowej oraz opisała prawidłowo schemat ich analizy, co zasługuje na podkreślenie.

Analiza statystyczna została przeprowadzona w oparciu o właściwie dobrane testy statystyczne. Uzyskane wyniki zostały przedstawione w przejrzystej formie zawierającej krótkie opisy podgrup badanych pacjentów oraz prezentacje tabelaryczne. Autorka poddała dokładnej analizie cytometrycznej komórki niszy szpikowej CD34+CD38- w odniesieniu do: całej populacji komórek szpiku kostnego (% total), odsetka blastów wykazujących ekspresję CD34+ (% blastów CD34+) oraz stosunku komórek niszy szpikowej do populacji blastów CD34+, we wszystkich badanych grupach pacjentów. Uzyskane wyniki pozwoliły wysnuć wnioski, iż w obszarze komórek niszy szpikowej CD34+CD38- obecne są zarówno HSC jak i LSC. Zarówno w AML jak i w MDS odsetek komórek CD34+CD38- jest wyższy niż w grupie kontrolnej. U pacjentów z AML odsetek komórek badanej niszy szpikowej jest większy aniżeli w pozostałych grupach badanych.

W kolejnym etapie badania autorka zbadała poziom ekspresji cząsteczki CLL-1 wśród komórek CD34+CD38- identyfikując je jako LSC. Do ocenianych parametrów należały: średnia intensywność fluorescencji (ang. *mean fluorescence intensity*; MFI), wielkość (ang. *forward scatter*; FSC) i ziarnistość (ang. *side scatter*; SSC) komórek LSC w odniesieniu do ich wartości procentowych tj. całej populacji komórek szpiku kostnego (% total), odsetka blastów wykazujących ekspresję CD34+ (% blastów CD34+) oraz liczby komórek CD34+CD38-CLL-1+ w przeliczeniu na 1 μ L szpiku kostnego. Uzyskane wyniki pozwoliły stwierdzić, że zarówno pacjentów z AML jak i z MDS cechuje obecność komórek złośliwych. Pacjenci z AML mają wyższy odsetek badanych komórek niż pacjenci z MDS co potwierdza, że AML jest bardziej agresywnym nowotworem. Komórki CD34+CD38-CLL-1+ są natomiast nieobecne u osób, które osiągnęły całkowitą remisję, AML-CR. Wykazano, że odsetek komórek LSC nie ma związku z wiekiem, płcią czy liczbą WBC zarówno u pacjentów z AML, jak i z MDS. Nie ma również związku z rokowaniem jednak odnotowano trend wzrostowy, to znaczy, im wyższy jest odsetek komórek LSC tym gorsze rokowanie.

Dodatkową wartością pracy jest zaprezentowanie trzech przypadków diagnostycznych, które potwierdzają, iż w pracy prawidłowo wybrano analizowane parametry cytometryczne. Ma to szczególne znaczenie z ocenie remisji i przewidywaniu ryzyka nawrotu choroby.

Rozdział dyskusji został napisany zwięźle i logicznie. Autorka konfrontuje wyniki z własnego badania z pracami innych autorów. Zrobiła to w oparciu o dobrze dobrane piśmiennictwo, wykazując wystarczającą wiedzę omawianych zagadnień.

W oparciu o przeprowadzone badania Doktorantka sformułowała wnioski, które wskazują na wysoką wartość diagnostyczną oceny odsetka komórek CD34+CD38-CLL-1+ w diagnostyce AML i MDS. U pacjentów z AML ma to znaczenie w definiowaniu jakości remisji choroby oraz przewidywaniu ryzyka nawrotu. Zaś u pacjentów z MDS ocena odsetka komórek LSC ma znaczenie w ocenie ryzyka transformacji do AML.

Stwierdzam, że przedstawione badanie zostało dobrze zaprojektowane i prawidłowo wykonane, a jego wyniki stanowią ważny głos w dyskusji nad biologią AML i MDS. Doktorantka wykazała się gruntowną znajomością tematu i umiejętnością rozwiązywania zadania badawczego, do których niezbędna jest wiedza kliniczna.

W mojej opinii przedstawiona do oceny praca 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” spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim, dlatego wnioskuję do Wysockiej Rady Naukowej Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie o dopuszczenie pani mgr Ewy Dobak do dalszych etapów postępowania doktorskiego.



Dr hab.n.med. Konrad Ptaszyński, Profesor UWM

Olsztyn, dn.26 maja 2023 r.