

Dr hab.n.med. Małgorzata Krawczyk-Kuliś

Katowice, 02.03.2015

Katedra i Klinika Hematologii i Transplantacji Szpiku

Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach

ul. Dąbrowskiego 25

40-032 Katowice

Recenzja

Rozprawy doktorskiej na stopień naukowy doktora nauk medycznych

lekarz Izabeli Dereń-Wagemann

pt.: "Prognostyczne znaczenie autofagii oraz apoptozy komórek blastycznych ostrych białaczek szpikowych w leczeniu indukującym remisję choroby."

Przedstawiona do recenzji rozprawa została zrealizowana pod naukową opieką Profesora dr hab.n.med. Kazimierza Kuliczewskiego w Katedrze i Klinice Hematologii, Nowotworów Krwi i Transplantacji Szpiku Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu.

Badania mechanizmów działania leków stosowanych w leczeniu białaczek są prowadzone w wielu ośrodkach światowych a ich poznawanie przyczynia się do postępu w leczeniu nowotworów hematologicznych. Ostre białaczki szpikowe w populacji osób dorosłych występują z częstością od 3,5 w wieku do 50 lat do 15/100000 mieszkańców w wieku 70 lat. W leczeniu stosowana jest intensywna chemioterapia. Skuteczność terapii zależy od występowania tzw. czynników prognostycznych, które podzielono na grupę czynników zależnych od pacjenta i grupę – zależnych od klonu białaczkowego. Wybór protokołu leczenia zależy od stopnia ryzyka cytogenetyczno-molekularnego białaczki oraz uwzględnia stan biologiczny pacjenta.

Głównym działaniem cytostatyków jest indukcja szlaków apoptotycznych w komórkach białaczkowych. Autorka szczegółowo zajęła się dwoma procesami będącymi efektem stosowanej chemioterapii, prowadzącymi do śmierci komórek nowotworowych – autofagią i apoptozą.

Doktorantka podjęła bardzo ważny i aktualny temat badawczy. Badania prospektywne obejmujące pacjentów w trakcie stosowanego leczenia ostrej białaczki szpikowej są oryginalnym podejściem do założonego problemu badawczego.

Recenzowana praca liczy 103 strony, układ jest typowy dla rozpraw doktorskich. Tekst podzielono na 11 rozdziałów, zachowano odpowiednie proporcje. Spis treści z podaniem stron, spis stosowanych skrótów, spis 10 rycin i 39 tabel ułatwiają zapoznanie się i analizę rozprawy. Pozytywnie oceniam umieszczenie w tabelach szczegółowych wyników badań i danych klinicznych pacjentów będących przedmiotem prowadzonych badań (Tabela 36 i 37). Praca napisana została poprawnie językowo i stylistycznie. Nieliczne błędy interpunkcyjne i literowe, które zdarzają się, nie utrudniają zrozumienia rozprawy.

Streszczenie oraz słowa kluczowe przedstawiono zarówno w języku polskim jak i angielskim.

W pracy zacytowano 186 pozycji literaturowych uwzględniając najnowsze publikacje dotyczące tematu badawczego. Drobna uwaga redakcyjna: w piśmiennictwie przy powoływaniu się na pozycje książkowe należałoby podać tytuł rozdziału i zakres stron (np. pozycja piśmiennictwa nr 5).

Dobór oraz zasady powoływania się na literaturę świadczą o wiedzy Doktorantki i umiejętności odpowiedniego wykorzystywania źródeł.

We **wstępie** w usystematyzowany sposób przedstawione zostały informacje na temat definicji, kryteriów rozpoznania oraz podziałów ostrych białaczek szpikowych, czynników prognostycznych oraz podstaw wyboru stosowanego leczenia. Autorka podkreśla, że główną zasadą działania leków cytostatycznych jest indukcja szlaków apoptotycznych w komórkach białaczkowych poprzez uszkodzenie DNA co wpływa na pobudzenia apoptozy. Proces apoptozy został przez doktorantkę zdefiniowany, szczegółowo zostały opisane jego drogi sygnałowe oraz czynniki biorące w nim udział. Kolejno scharakteryzowany został proces autofagii. Przedstawiona w tekście terminologia podaje zarówno definicję śmierci komórki wskutek autofagii jak i określa czynnościowe markery tego procesu, którymi są lipidacja lekkich łańcuchów białka związanego z mikrotubulami oraz zwiększona degradacja autofagalnych substratów takich jak np. sekwestosom. Omówiony aktualny podział autofagii wyróżniający trzy jej postaci: makroautofagia, mikroautofagia i autofagia zależna od białek opiekuńczych (czaperonów) przybliży czytelnikowi zarówno mechanizmy tych procesów jak i ich znaczenie dla homeostazy organizmu. Procesy autofagii mają bowiem znaczenie zarówno w rozwoju nowotworów jak i odgrywają rolę w odpowiedzi na zastosowane leczenie, co również zostało szczegółowo i przejrzyście omówione w kolejnych podrozdziałach wstępu.

Kolejno Doktorantka omawia związek pomiędzy procesami autofagii i apoptozy, charakteryzuje białko ATG5 i białko LC3, które będą przedmiotem oznaczeń w prowadzonych badaniach oraz prezentuje dane dotyczące regulacji ekspresji genów uczestniczących w apoptozie i autofagii w ostrych białaczkach szpikowych. W ostatnim podrozdziale wstępu zatytułowanym: „Rola autofagii i apoptozy w leczeniu cytostatycznym ostrych białaczek szpikowych” w sposób umiejętny i wyczerpujący doktorantka uzasadnia powody, które skłoniły ją do podjęcia tego tematu badawczego.

W oparciu o dane przedstawione we wstępie **Doktorantka sformułowała następujący główny cel badawczy: „Zbadanie prognostycznego znaczenia autofagii oraz apoptozy komórek blastycznych u chorych na ostrą białaczkę szpikową przed i po leczeniu indukującym remisję choroby”.**

Cele szczegółowe służące realizacji zadania badawczego zostały przez Doktorantkę określone jako pytania, na które zamierzała odpowiedzieć.

1. Czy odsetek komórek apoptotycznych znajdujących się we wczesnej lub w późnej fazie apoptozy u pacjentów przed chemioterapią indukująca remisję wykazuje różnice w zależności od uzyskania remisji po indukcji?
2. Jak chemioterapia indukująca remisję zmienia odsetek komórek apoptotycznych u chorych na ostre białaczki w zależności od uzyskania remisji?
3. Czy ekspresja białek ATG5, MAP1LC3 oraz LC3-IB i LC3-IIB przed leczeniem indukującym remisję u chorych na ostre białaczki wykazuje różnice w zależności od odpowiedzi na leczenie?

4. Czy istnieje korelacja pomiędzy odsetkiem komórek apoptotycznych, poziomem ekspresji białka MAP1LC3 przed i po zastosowaniu leczenia indukującego a całkowitym czasem przeżycia pacjentów?

Kolejny rozdział omawiający **materiał i metody**, w którym Doktorantka prezentuje grupę badaną zatytułowany został: „Pacjenci”. Prospektywnymi badaniami objęto 38 pacjentów leczonych w okresie latach 2011 – 2014 w Klinice Hematologii, Nowotworów Krwi i Transplantacji Szpiku Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu. Szczegółową charakterystykę grupy badanej oraz zastosowanego leczenia indukującego Doktorantka zamieściła w tabelach. W rozdziale zawarto informacje o uzyskaniu akceptacji Komisji Bioetycznej, a kopia Opinii Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym we Wrocławiu dołączona została do zwanego druku Rozprawy (str. 102 i 103). Materiałem do badań była krew obwodowa pobierana przed rozpoczęciem chemioterapii indukującej oraz w 12-24 godziny po jej rozpoczęciu. Dla oceny komórek w okresie wczesnej i późnej apoptozy wykonywano badanie cytofluorometryczne. W badaniach procesów autofagii stosowano metody PCR w czasie rzeczywistym oceniając ekspresję genów ATG5 i MAP1LC3. Detekcję białek LC3-I i LC3-II prowadzono metodą Western blot. Badania cytofluorometryczne wykonywano w Specjalistycznym Laboratorium Diagnostyki Hematologicznej i Transplantacyjnej Kliniki, badania molekularne metodą RQ-PCR – w Pracowni Biologii Molekularnej Katedry Histologii i Embriologii Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu a badania metodą Western blot – w laboratorium Katedry Biochemii, Farmakologii i Toksykologii Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu. Zastosowane metody badawcze zostały prawidłowo dobrane i szczegółowo opisane w rozprawie.

Do analiz statystycznych wykorzystano pakiet programów statystycznych EPIINFO Ver.7.1.1.14 (02-07-2013).

Wyniki badań przedstawione zostały w sposób opisowy oraz zawarte w tabelach i rycinach, dzięki czemu ich prezentacja jest przejrzysta. Kolejność omawiania uzyskanych wyników jest logiczna i stanowi szczegółowe odpowiedzi na postawione pytania. Wszystkie wyniki badań poddano analizom statystycznym, a wyniki poszczególnych analiz statystycznych zaprezentowano w odpowiednich fragmentach opracowania i podano ich interpretację.

Poszczególne analizy statystyczne wyników badań dotyczyły oceny: odsetka komórek apoptotycznych w fazie apoptozy wczesnej i późnej oznaczonych przed leczeniem indukującym oraz po leczeniu indukującym w zależności od uzyskania remisji. Przed zastosowaniem leczenia nie stwierdzono różnicy w odsetku komórek apoptotycznych pomiędzy grupą pacjentów, którzy uzyskali lub nie uzyskali remisji. Statystycznie istotną różnicę stwierdzono jedynie w odsetku apoptozy późnej oraz w obrębie całkowitego odsetka komórek apoptotycznych (apoptozy wczesnej i późnej) oznaczonej po leczeniu indukującym. Po leczeniu u pacjentów z remisją białaczki odsetek komórek apoptotycznych był znamienne wyższy niż u chorych, którzy nie uzyskali remisji. Ważnym jest stwierdzenie, że w grupie chorych osiągających remisję po leczeniu występował przyrost odsetka komórek w fazie apoptozy wczesnej i apoptozy późnej oraz całkowitego odsetka komórek apoptotycznych (łącznie w fazie apoptozy wczesnej i późnej) w porównaniu z okresem przed leczeniem. Zależność taka nie występowała u pacjentów, którzy nie uzyskali remisji. Istotnym elementem opracowania jest porównanie zmian w odsetku komórek apoptotycznych po zastosowanym leczeniu pomiędzy grupą z remisją i grupą bez remisji. Stwierdzono, że w grupie pacjentów z remisją, zmiana odsetka komórek

apoptotycznych w fazie apoptozy późnej oraz całkowitego odsetka komórek apoptotycznych (faza apoptozy wczesnej i apoptozy późnej) była większa niż w grupie bez remisji.

Badając markery procesów autofagii analizowano ekspresję białka ATG 5 i białka MAP1LC3 w grupach pacjentów utworzonych zależnie od uzyskania remisji białaczki. Zarówno przed zastosowaniem leczenia indukującego jak i w badaniu wykonanym po leczeniu nie stwierdzono różnicy w ekspresji białka ATG5 i białka MAP1LC3 pomiędzy chorymi, którzy uzyskali remisję lub jej nie uzyskali. Również porównanie ekspresji tych białek u chorych przed i po leczeniu, w grupie, którzy uzyskali remisję jak i w grupie chorych, którzy nie uzyskali remisji – nie wykazało istotnych różnic, chociaż stwierdzono, że poziom ekspresji białka MAP1 LC3 po leczeniu u chorych z remisją wykazywał trend wzrostowy w porównaniu do badania wykonanego przed rozpoczęciem terapii ($p=.0930$).

Wyniki badania poziomu ekspresji białek LC3-I i LC3-II przed i po zastosowaniu chemioterapii indukującej nie wykazały różnic w grupie chorych z remisją białaczki jak i u pacjentów bez remisji.

Analizą podsumowującą jest przeprowadzenie oceny całkowitego przeżycia badanych pacjentów i ocena korelacji pomiędzy całkowitym przeżyciem a takimi parametrami jak: różnica w odsetku komórek w fazie apoptozy późnej, różnica w całkowitym odsetku komórek w fazie apoptozy wczesnej i późnej oraz różnica w ekspresji białka MAP1 LC3 oznaczonymi przed i po podaniu chemioterapii. Wykreślona krzywa przeżycia całkowitego obrazuje znamienne wyższy odsetek przeżycia w grupie chorych, którzy uzyskali całkowitą remisję, co dodatkowo zostało zobrazowane danymi szczegółowymi umieszczonymi w tabeli określającymi odsetek pacjentów z czasem przeżycia 10, 12 i 15 miesięcy.

W wykonanych badaniach Doktorantka stwierdziła, że istnieje istotna dodatnia korelacja pomiędzy wzrostem po chemioterapii odsetka komórek apoptotycznych w fazie apoptozy późnej i całkowitej oraz wzrostem ekspresji białka MAP1 LC3 a dłuższym czasem przeżycia pacjentów.

Przedstawione wyniki dokumentują zrealizowanie założonego celu badawczego w pełnym zakresie.

W rozdziale zatytułowanym **Omówienie** Doktorantka na tle innych doniesień prezentuje wyniki własnych badań mających ocenić czy na uzyskanie odpowiedzi na leczenie cytostatyczne, u pacjentów z ostrą białaczką szpikową, może mieć wpływ odsetek komórek apoptotycznych w różnych fazach apoptozy a także ekspresja wybranych znaczników autofagii (białka ATG5, MAP1 LC3, LC3-I i LC3-II).

W strukturze tego rozdziału wydzielono cztery podrozdziały, w których przedstawiono odpowiedzi na pytania służące realizacji celu badawczego.

W podrozdziale zatytułowanym: „Wpływ odsetka komórek apoptotycznych przed leczeniem na uzyskanie remisji” Doktorantka szczegółowo i krytycznie analizuje uzyskane wyniki przeprowadzonych badań starając się wyjaśnić przyczyny różnic pomiędzy własnymi spostrzeżeniami a wnioskami innych badaczy. Wyniki badań Doktorantki częściowo odbiegają od uzyskanych przez innych badaczy, w których wykazano znaczenie apoptozy badanej przed rozpoczęciem chemioterapii jako czynnika prognostycznego. Zgadzam się z wyrażoną opinią, że różnice mogły wynikać np. z odmienności metodyki badania (ocena w populacji komórek blastycznych vs ocena w mononuklearach krwi obwodowej) oraz liczebności grupy badanej. Doktorantka dodatkowo przeanalizowała ten problem biorąc pod uwagę liczbę pacjentów z odsetkiem komórek

apoptotycznych powyżej mediany wykazując, że w badanej grupie chorych, którzy uzyskali remisję było ich więcej. Na tej podstawie stwierdziła, że można przypuszczać iż większa gotowość komórek do apoptozy może sprzyjać uzyskaniu odpowiedzi na leczenie cytostatyczne, co zbliża wyniki przez nią uzyskane do prezentowanych w przywołanej literaturze.

Cenną i nowatorską jest obserwacja Doktorantki stwierdzająca, że po leczeniu cytostatycznym jedynie u chorych, którzy uzyskali remisję, występuje istotne zwiększenie odsetka komórek apoptotycznych w fazie apoptozy wczesnej, późnej i całkowitej. W podrozdziale zatytułowanym: „Wpływ leczenia cytostatycznego na apoptozę w zależności od uzyskania remisji choroby” problem ten został bardzo drobiazgowo przedstawiony w oparciu o analizę oceny klinicznej grupy badanej. Wynik ten jest szczególnie ważny, gdyż na ten temat istnieją bardzo nieliczne doniesienia. Sformułowane na zakończenie rozdziału zdanie, że: „można podejrzewać, że aktywność apoptozy jest wypadkową wielu czynników, takich jak: indywidualna wrażliwość komórek na chemioterapię, intensywność leczenia cytostatycznego oraz genetyka choroby.” świadczy o dojrzałości naukowej Doktorantki, która swobodnie porusza się w zakresie prowadzonych badań i nie boi się wysuwać na ich podstawie przypuszczeń i hipotez.

Szczególnie ważnym jest omówienie wyników badań autofagii, gdyż doniesienia na temat roli autofagii w czasie chemioterapii ostrych białaczek są nieliczne a wyniki badań są niejednoznaczne.

W podrozdziale pt: „Ekspresja białek ATG5, PAP1LC3 oraz LC3-IB i LC3-IIB u chorych na ostre białaczki” Doktorantka analizuje własne wyniki w porównaniu z danymi z piśmiennictwa. Autorka słusznie zauważa, że procesy apoptozy i autofagii mogły zachodzić równocześnie, a u chorych z remisją proces apoptozy mógł dominować nad autofagią. Może to stanowić wyjaśnienie braku różnic w badaniach ekspresji białka ATG5 i MAP1LC3 zarówno przed jak i po leczeniu u pacjentów z remisją i bez remisji.

Oryginalnym osiągnięciem Doktorantki jest stwierdzenie, że zwiększenie ekspresji białka MAP1LC3 po leczeniu indukującym u pacjentów z remisją białaczki nie było związane ze zmianą stężenia białka LC3-IB i LC3-IIB, co sugeruje, że ekspresja białka MAP1LC3 jest regulowana przez dodatkowy, inny czynnik np. miRNA, działający na poziomie potranskrypcyjnej regulacji ekspresji genów. Zwiększenie po leczeniu indukującym ekspresji białka MAP1LC3 u chorych z remisją może wskazywać na to, że mononukleary wykazują większą gotowość do wejścia na szlak autofagii, ale czynnik działający na poziomie potranskrypcyjnej regulacji genów zmienia przebieg tego procesu, regulując go w sposób negatywny. W dalszej części tego podrozdziału Doktorantka w sposób szczegółowy dyskutuje inne aspekty związane z procesem autofagii w komórkach macierzystych i komórkach blastycznych uzasadniając, że dobra odpowiedź na leczenie może mieć związek z większą gotowością komórek blastycznych na wejście na szlak autofagii. Pośrednim potwierdzeniem tej tezy są wyniki badań Doktorantki: ekspresja białka MAP1LC3 wykazywała trend wzrostowy po leczeniu u chorych, którzy osiągnęli remisję. W podsumowaniu tej części dyskusji autorka stwierdza, że na podstawie przeprowadzonych badań można przypuszczać, że jedną z przyczyn nieskuteczności terapii były zaburzenia procesu apoptozy.

Na zakończenie omówienia w podrozdziale pt. „Korelacja pomiędzy odsetkiem komórek apoptotycznych, poziomem ekspresji białka MAP1LC3 przed i po zastosowaniu leczenia indukującego a całkowitym czasem przeżycia pacjentów”, Doktorantka podsumowuje własne doświadczenia badawcze stwierdzając, że aktywność apoptozy jest przydatnym wskaźnikiem dobrej prognozy

leczenia chorych na ostrą białaczkę szpikową. W pełni zgadzam się ze stwierdzeniem, że potwierdzenie wpływu autofagii na uzyskanie odpowiedzi na leczenie wymaga dalszych badań i uważam, że podjęcie takiej tematyki badań przyczyni się do rozpowszechnienia wiedzy o tym interesującym zagadnieniu.

Na zakończenie rozprawy Doktorantka przedstawiła cztery wnioski, które są odpowiedzią na zadane w celu pracy pytania.


1. Apoptoza spontaniczna mierzona odsetkiem komórek apoptotycznych przed rozpoczęciem leczenia indukującego nie miała wpływu na wynik tego leczenia u pacjentów z rozpoznaniem ostrej białaczki szpikowej.
2. U pacjentów, którzy uzyskali remisję całkowitą, występował wyższy odsetek komórek apoptotycznych po leczeniu indukującym, w związku z tym może on być wskaźnikiem prognostycznym w ostrej białaczce szpikowej.
3. Badana w pracy ekspresja białek takich jak ATG5 i MAP1LC3, które to mówią o aktywności procesu autofagii, nie zmieniała się po leczeniu indukującym remisję w stosunku do ekspresji przed leczeniem poza tendencją wzrostową (ale nieistotną statystycznie) ekspresji białka MAP1LC3.
4. Dłuższy czas przeżycia miał związek z odsetkiem komórek w fazie apoptozy późnej i całkowitej oraz tendencją wzrostową ekspresji białka MAP1LC3.

Doktorantka w pełni zrealizowała zaplanowane badania i osiągnęła założony cel badania. Rozprawę doktorską oceniam pozytywnie i nie mam do niej uwag. Szczególnie wysoko oceniam wybór tematyki i perspektywny charakter badania opartego o materiał kliniczny. Uważam, że badania zasługują na kontynuację a w przyszłości mogą mieć również implikacje praktyczne.

Podsumowując, stwierdzam, że oceniona przeze mnie rozprawa Lekarka Izabeli Dereń-Wagemann pt.: "Prognostyczne znaczenie autofagii oraz apoptozy komórek blastycznych ostrych białaczek szpikowych w leczeniu indukującym remisję choroby." spełnia wszystkie wymagania określone w art. 13.ust.1 Ustawy z dnia 14 marca 2003r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki stawiane rozprawom doktorskim.

Wnioskuje do Rady Wydziału Lekarskiego Kształcenia Podyplomowego Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu o dopuszczenie Lekarki Izabeli Dereń-Wagemann do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie składam wniosek o wyróżnienie przedstawionej rozprawy doktorskiej.

Z wyrazami szacunku:


Dr hab.n.med. Małgorzata Krawczyk-Kuliś

Katedra i Klinika Hematologii i Transplantacji Szpiku

Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach