

Katedra i Klinika Hematologii, Onkologii i Chorób Wewnętrznych

Warszawski Uniwersytet Medyczny

Kierownik: prof. dr hab. med. Wiesław Wiktor Jędrzejczak

Samodzielny Publiczny Centralny Szpital Kliniczny

ul. Banacha 1a, 02-097 Warszawa

Telefon/Telefax: (22) 599-28-18

Warszawa, dnia 29.05.2017

Opinia o rozprawie doktorskiej lek. Olgi Dobrzyńskiej pt. „Znaczenie wybranych czynników proangiogennych w ostrych białaczkach szpikowych”

Przesłana do oceny praca składa się z 92 stron i typowych dla tego typu opracowań części tj. ze wstępu, założeń i celów pracy, materiałów, metod, omówienia, podsumowania i wniosków, piśmiennictwa, streszczenia w języku polskim i angielskim oraz załączników. Praca jest poprzedzona spisem treści oraz wykazem najważniejszych skrótów używanych w publikacji. Zawiera 25 tabel, 22 ryciny i 178 pozycji piśmiennictwa.

We wstępie liczącym 29 stron, doktorantka w sposób szczegółowy i pieczołowity wprowadza czytelnika w tematykę ostrych białaczek szpikowych (OBSz), przechodząc do szerokiego omówienia angiogenezy, a następnie czynników będących głównym przedmiotem opracowania: EGFL7, HIF-1, leptyny oraz jej receptora. Omówienie OBSz to zwięzłe, ale też dokładne i nowoczesne potraktowanie tematu, z którego skorzysta zarówno hematolog jak i osoba z innej dziedziny. Pokazane zostało spektrum problemów towarzyszących diagnostyce i leczeniu OBSz, wykazane niedostatki w obecnym stanie wiedzy, co uwypukla potrzebę prowadzenia badań nad tematem. Następnie, doktorantka przechodzi do omówienia zagadnienia angiogenezy – pozornie zaskakującego w związku z ostrymi białaczkami, które jako nowotwory pierwotnie rozsiane, w przeciwieństwie do guzów litych, wydają się nie wymagać dodatkowego unaczynienia. Po tym, jak czytelnik zaznajamia się z istotą angiogenezy, jest wprowadzany w zagadnienie roli angiogenezy w patogenezie nowotworów litych. Szczegółowo, być może zbyt szczegółowo omówiona jest rola czynnika VEGF i VEGFR w angiogenezie nowotworowej, ale stanowi to dobre tło do zaprezentowania dostępnych już w praktyce klinicznej terapii antyangiogennych. Ostatecznie dowiadujemy się,

że przekonania o znikomej roli angiogenezy w ostrej białaczce szpikowej są błędne, bowiem istnieje szereg dowodów na to, że w chorobie tej zachodzi patologicznie nasiloną angiogenezę. Przedyskutowano wyniki dotychczasowych badań, skupiając się głównie na występowaniu w OBSz czynników proangiogennych.

Z punktu widzenia recenzenta, zabrakło szerszego przedstawienia roli naczyń krwionośnych, a konkretnie śródbłonna w tworzeniu niszy szpikowej komórek macierzystych oraz komórek białaczkowych. Pozwoliło by to na szersze spojrzenia na angiogenezę – nie tylko jako czynnik prognostyczny, czy też unaczynienie, ale jako na element ekosystemu białaczki w szpiku kostnym, jej funkcje protekcyjne, związane z migracją i stanem uśpienia. W dalszej kolejności, doktorantka przechodzi do bardzo szczegółowego omówienia czynników będących przedmiotem analizy: naskórkowego czynnika wzrostu podobnego do domeny 7 – EGFL7; czynnika indukowanego hipoksją-1 (HIF-1) oraz leptyny i jej receptora. Omówienie to stanowi 15 stron rozprawy – jest bardzo szczegółowe, być może zbyt szczegółowe w kontekście wykonywanych następnie badań. Przedyskutowano przeróżne aspekty ww czynników w nowotworach, w tym odniesiono się do istniejących już wyników badań w nowotworach hematologicznych. Należy przyznać, że tą część rozprawy czyta się raczej ciężko, co być może związane jest z ogromną liczbą skrótów i zawiłą naturą tematyki. Spośród ww czynników, doktorantka poświęciła najwięcej uwagi leptynie i jej receptorowi, a warto by było zrównoważyć omawianie tych czynników. Podsumowując, wstęp stanowi wnikliwe opracowanie zagadnienia angiogenezy także w kontekście OBSz powiązane z dokładnym przedyskutowaniem czynników będących przedmiotem analizy.

Celem pracy była ocena ekspresji czynników EGFL7, HIF-1alfa i Ob-R (receptora dla leptyny) w nowo rozpoznanych ostrych białaczkach szpikowych oraz badanie korelacji ich ekspresji z parametrami uwzględnianymi w diagnostyce jako czynniki prognostyczne oraz z wynikami klinicznymi. Cel został jasno opisany i nie można mieć co do tego wątpliwości.

Do badania wykorzystano materiał i dane kliniczne od grupy 103 pacjentów z ostrą białaczką szpikową z wykluczeniem OBSz promielocytowej, leczonych w macierzystej jednostce oraz od 20 zdrowych osób (grupy kontrolnej). Wielkość próby uważam za wystarczającą. Zabrakło informacji o uzyskaniu zgody Komisji Bioetycznej na ww. badania oraz zgody pacjenta na wykonywanie badań genetycznych. Badania genetyczne prowadzono z wykorzystaniem próbek szpiku, po wcześniejszej izolacji komórek jednojądrzastych i lizowaniu erytrocytów. Próbkę były przechowywane w temp. -75oC jako suchy osad lub w roztworze odczynnika do izolacji RNA. Zabrakło informacji o czasie tego przechowywania. O ile w przypadku analiz DNA nie stanowiło by to problemu, to w przypadku ilościowych

oznaczeń RNA mogło istotnie wpływać na wyniki. Najbezpieczniej było by przechowywać cDNA. Można mieć też wątpliwości co do zasadności wykonywania analiz w pełnym szpiku. Jeśli badamy ekspresję ww. czynników w blastach białaczkowych, to należało je wpięrow wyizolować (np. metodą magnetyczną) – w przeciwnym wypadku, tam, gdzie blastów było 20%, oznaczenia dotyczyły szeregu innych komórek, w tym podścieliska. Nie mam zastrzeżeń do metody izolacji RNA, odwrotnej transkrypcji i Q-PCR, ani do metod statystycznych.

Niestety, z ubolewaniem muszę stwierdzić, że rozczarowało mnie zastosowanie jedynie ilościowej analizy RNA w celu udowodnienia postawionych tez. Badane czynniki są białkami. Ekspresja mRNA niekoniecznie musiała wpływać na ich translację i co za tym idzie funkcję. Oczekiwałem dodatkowych oznaczeń, choćby w wybranych, niewielkich grupach pacjentów. Należało by tu myśleć np. o ekspresji czynników w próbkach metodą Western Blott, może też ekspresji białek w surowicy pacjentów. Szczytem marzeń było by wykazanie ekspresji i jej lokalizacji w trepanobioptatach szpiku za pomocą immunohistochemii lub immunofluorescencji. Wydaje mi się, że takie oznaczenia będą niezbędne, aby wyniki w dobrym piśmie opublikować.

Przedstawione wyniki dotyczą analizy ekspresji mRNA dla wybranych czynników EGFL7, HIF-1alfa i Ob-R w OBSz vs. w zdrowym szpiku, w podgrupach pacjentów w zależności od ekspresji markera CD34, stopnia dojrzałości komórek białaczkowych, czynników genetycznych, innych czynników potencjalnie prognostycznych oraz charakteryzujących pacjentów oraz w grupach ryzyka. Podobnie, przedstawiono wzajemne relacje ekspresji tych białek jak też badano korelację z wynikami leczenia.

Na samym początku rozdziału „Wyniki” zabrakło choć pobieżnego przedstawienia charakterystyki pacjentów, która zawarta została w Tabeli 3. Nie widzę uzasadnienia przedstawienia na Wykresie I krzywych przeżycia dla chorych leczonych paliatywnie i intensywnie. Na podstawie przedstawionych wyników wykazano w OBSz istotnie wyższą ekspresję mRNA dla EGFL7, niższą HIF-1alfa oraz brak istotnych różnic dla mRNA Ob-R w porównaniu z grupą kontrolną. Tabele, w których przedstawiono wyniki są jednak bardzo nieczytelne – dotyczy to zdecydowanej większości tabel. Sytuację ratują wykresy, które jednoznacznie przedstawiają wyniki. Należy jednak zwrócić uwagę na bardzo duży rozrzut wartości, zwłaszcza w grupie badanej. Dalej, przedstawiono analizę w podgrupach OBSz, w zależności od ekspresji CD34 – markera mającego świadczyć o młodszym charakterze blastów. Białaczka CD34+ charakteryzowała się istotnie wyższą ekspresją EGFL7 i niższą HIF-1alfa w porównaniu do szpiku zdrowego, za to podwyższoną ekspresją wszystkich

czynników w stosunku do białaczki CD34-. Analizy przeprowadzono też w grupach morfologicznych: w nieodróżnicowanej i bez dojrzewania, z dojrzewaniem i mielomonocytovej, monoblastycznej/monocytovej. Taki podział intuicyjnie wydaje się właściwy, jednak wg obecnej klasyfikacji powinien być stosowany jedynie w grupie białaczek tzw. inaczej nie określonych (NOS), bez znanych czynników genetycznych. mRNA dla wszystkich analizowanych czynników podlegało najwyższej ekspresji w białaczkach nieodróżnicowanych, za to najwyższej w białaczkach mielomonocytowych/monoblastycznych. W wynikach znajduje się pisemna informacja, że nie wykazano korelacji pomiędzy ekspresją czynników angiogenezy, a grupami prognostycznymi wg ELN, poza HIF-1alfa. To bardzo ważna informacja, jako że system ten uważa się obecnie za najważniejszy wskaźnik prognostyczny. Wyniki te zostały jednak przedstawione zbyt pobieżnie, w nieczytelnej tabelce, bez wykresów. Ekspresja EGFL7 jak i HIF-1alfa była istotnie wyższa w przypadkach FLT3+ oraz NPM1+, w porównaniu do przypadków ujemnych. To ciekawe i niezrozumiałe, bo mutacje te mają przeciwstawne znaczenie prognostyczne. Zwłaszcza w kontekście dalszych wyników, mówiących o tym, że ekspresja HIF-1alfa i Ob-R korelowała z osiągnięciem całkowitej remisji po leczeniu indukcyjnym. W dalszej części „Wyników” opisano korelację czynników proangiogennych z innymi parametrami opisowymi chorych i białaczek. Najciekawsza wydaje się pozytywna korelacja ekspresji HIF-1alfa z wiekiem, który jest jednym z silniejszych czynników prognostycznych. Należy pochwalić doktorantkę, że uwzględniła możliwość wpływu stanu metabolicznego pacjenta, a konkretnie otyłości na ekspresję Ob-R – nie wykazując istotnych różnic.

Doktorantka podjęła się też przeanalizowania wzajemnych korelacji ekspresji opisywanych czynników, uzyskując pozytywne zależności w różnych kombinacjach. To zadziwiające, skoro wcześniej wykazywano często znaczenie odwrotne w kontekście analizowanych grup, ale to zapewne kwestia metod statystycznych. Przechodząc do kulminacyjnego punktu analiz w rozumieniu klinicysty, pokuszono się o wykazanie zależności pomiędzy ekspresją czynników proangiogennych, a głównymi punktami końcowymi większości badań: RFS i OS. Niestety statystyka w tym przypadku zawiodła, a różnice nie zostały wykazane. Czytelnik zostaje jednak pocieszony kolejną analizą, tym razem jednowariantową, w której doktorantka udowadnia że ekspresja HIF-1alfa powyżej punktu odcięcia związana jest z istotnie gorszym prawdopodobieństwem przeżycia. To wydaje się logiczne w kontekście wcześniej przedstawionych wyników i ciekawe.

Dyskusja jest przedstawiona jasno i rzetelnie. Doktorantka osobno omawia wyniki dotyczące ekspresji EGFL7, HIF-1alfa i Ob-R w kontekście dostępnych danych

literaturowych, wyciągając też własne wnioski i snując hipotezy. Być może zabrakło wytłumaczenia, skąd mógł wynikać wpływ HIF-1alfa na przeżycie pacjentów w analizie jednowariantowej, przy jego braku w analizie wielowariantowej i korelacji. Podobnie, zabrakło refleksji dotyczącej wzajemnych relacji analizowanych czynników. Należy podkreślić, że wykorzystywana do dyskusji literatura pochodzi nie tylko z dostępnych pełno tekstowych publikacji, ale też z doniesień na kluczowych konferencjach, co wymagało żmudnych poszukiwań. Doktorantka nadmienia, że praca doktorska jest jedynym doniesieniem wskazującym na ekspresję EGFL7 w OBSz, co zasługuje na szczególne uznanie. Najwyraźniej jest to gorący temat i należy spieszyć się z publikacją, jako że w maju br. ukazała się w PNAS praca pt. „Prognostic and biological significance of the proangiogenic factor EGFL7 in acute myeloid leukemia” (Papaioannou i in.) ukazująca tematykę w bardzo dogłębny i dobitny sposób.

Podsumowanie i wnioski przedstawione są klarownie i korespondują z postawionymi celami. Literatura przedstawiona jest w standardowy, poprawny sposób. Streszczenie pracy w odpowiedni sposób podsumowuje jej zawartość, pozwalając czytelnikowi raz jeszcze wychwycić najważniejsze obserwacje. Mogło by być tylko krótsze, bowiem zajmuje obecnie niemal 3 strony. Jako załączniki przedstawione zostały dwie tabele przedstawiające podstawowe dane demograficzne i ekspresję czynników proangiogennych u pojedynczych pacjentów i grupy kontrolnej. Szkoda, że w treści pracy nie odnalazłem odnośnika do tych tabel ani próby przedyskutowania pojedynczych, szczególnych pacjentów.

Praca doktorska nie jest wolna od drobnych błędów i uchybień, a obowiązkiem recenzenta jest je wypunktować. Są to:

- strona tytułowa: zabrakło tytułu zawodowego doktorantki
- str. 28, linijka 6: „średnie natlenienie szpiku kostnego wynosi 6.1%...” – co doktorantka miała na myśli?
- słowa łacińskie np. „de novo” powinny być pisane kursywą
- według opinii recenzenta zdań nie powinno rozpoczynać się od skrótów – tekst jest wtedy mało czytelny
- str. 36: RFS to nie „relapsed free survival” ale „relapse-free survival”
- str. 39 „szpik kostny pobierano do monowet” – co to takiego?
- str. 40 „kwartale” powinno być „kwartyle”
- doktorantka nie powinna używać pierwszej osoby tj. np. „z badałam, wykazałam, a raczej „zbadano, wykazano”

- przedstawianie istotności statystycznej np. „ $p=0,0000$ ” zgodnie ze skromną wiedzą statystyczną recenzenta nie wydaje się być poprawne, zwykle są to wartości poniżej min. błędu np. „ $p<0.0001$ ”. Podobnie, powinno się przedstawiać p z kropką, nie przecinkiem.
- W wielu miejscach EGFL7 pisane jest z małych liter, co przyjęto dla genów mysich, podczas gdy w większości przypadków z dużych.
- anglojęzyczna wersja streszczenia wymaga gruntownej korekty językowej, przykłady błędów to:
 - „patients obtain remission” – powinno być „achieve remission”
 - „despite intensive work on different mechanisms go to leukemogenesis” – nie wiadomo o co chodzi;
 - „Among stimuli factors specified inter alia” – bardzo niepopularne określenie;
 - „relapsed free survival” zamiast „relapse-free survival”

Powyższe drobne uchybienia nie umniejszają jednak ogromnej wartości merytorycznej przedstawionej do recenzji pracy.

Reasumując, uważam że lek. Olga Dobrzyńska wykonała badania o bardzo dużym znaczeniu poznawczym, powiększające naszą wiedzę o ostrej białaczce szpikowej i o angiogenezie w tym schorzeniu. To oryginalne i bardzo rozwojowe podejście do tematu OBSz – mam nadzieję, że praca przybliży nas do poprawy rokowania pacjentów w oparciu o lepsze poznanie biologii choroby. Rozprawa odpowiada warunkom określonym w art. 13 ust. 1 Ustawy z dnia 14.03.2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach naukowych i tytule naukowym w zakresie sztuki (Załącznik do obwieszczenia Marszałka Sejmu RP z dnia 2 grudnia 2014r. – Dz. U. poz. 1852). Tym samym, wnioskuję do Wysokiej Rady Wydziału Kształcenia Podyplomowego Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu o dopuszczenie jej do dalszych etapów przewodu doktorskiego, w tym do publicznej obrony rozprawy doktorskiej.

dr hab. med. GRZEGORZ BASAK
INTERNISTA, HEMATOLOG,
TRANSPLANTOLOG KLINICZNY
1883664

dr hab. med. Grzegorz Władysław Basak