

## OCENA

### **rozprawy doktorskiej lek. med. Olgi Dobrzyńskiej pt.: "Znaczenie wybranych czynników proangiogennych w ostrych białaczkach szpikowych"**

Ostra białaczka szpikowa (AML) stanowi 80% wszystkich ostrych białaczek u dorosłych pacjentów. Choroba występuje z częstością 4/100 000 mieszkańców rocznie. Etiologia AML jest nieznana. Powszechnie wiadomo, że u podstaw AML leży klonalna proliferacja komórek prekursorowych poszczególnych linii układu krwiotwórczego, która doprowadza do zaburzeń w prawidłowej hematopoezie. Leukemogeneza jest złożonym, wieloetapowym procesem, w którym dochodzi do wzajemnej interakcji różnorodnych czynników. Pomimo intensywnych badań, nie została jeszcze do końca poznana. Dotychczas wyodrębniono wiele czynników predysponujących do rozwoju AML. Wśród środowiskowych czynników ryzyka wymienia się przede wszystkim narażenie na promieniowanie jonizujące, ekspozycję na benzen, przewlekły nikotynizm. Duże znaczenie przypisuje się również wcześniejszej chemioterapii. Istotną rolę w rozwoju AML mogą odgrywać także wrodzone defekty genetyczne. Wśród czynników rokowniczych wymienia się przede wszystkim zaburzenia cytogenetyczne i molekularne, stanowiące o charakterystyce klonu białaczkowego, a także czynniki zależne od pacjenta, takie jak stan ogólny, wiek czy choroby współistniejące. W ostatnich latach pojawiły się doniesienia sugerujące, że w patogenezie nowotworów hematologicznych, takich jak ostre i przewlekłe białaczki, zespoły mielodysplastyczne, nowotwory mieloproliferacyjne czy szpiczak plazmocytowy istotną rolę odgrywają procesy angiogenezy. Termin angiogeneza oznacza tworzenie nowych naczyń krwionośnych w uprzednio istniejącej sieci naczyniowej. W warunkach fizjologicznych ma to miejsce np. w ciąży, w trakcie gojenia się ran. Fizjologiczne procesy angiogenezy są poddane ścisłej kontroli i regulacji. Natomiast angiogeneza zachodząca w związku z procesami zapalnymi lub w chorobach nowotworowych to bardziej chaotyczny i nie poddający się

systemom regulacji proces. Historię badań nad angiogenezą nowotworów rozpoczął Folkman w latach 70 ubiegłego wieku. Jego pionierskie badania wykazały związek pomiędzy angiogenezą, a wzrostem guza nowotworowego, jego inwazyjnością i zdolnością do tworzenia przerzutów. Obecnie, po ponad 40 latach badań, mimo zarejestrowania pierwszych leków działających za pośrednictwem mechanizmów antyangiogennych nadal nie znamy odpowiedzi na wiele pytań, a złożone mechanizmy regulacji procesów angiogenezy nie są całkowicie jasne.

W przebiegu procesu nowotworowego dochodzi do zaburzenia równowagi pomiędzy czynnikami stymulującymi a hamującymi angiogenezę, na korzyść tych pierwszych tzw. „angiogenic switch”. Uważa się, że jest to dla wzrostu guzów litych punkt zwrotny — od tego momentu wzrost guza jest bardziej agresywny, nabiera on zdolności do tworzenia przerzutów. Wykazano, że cytokiny proangiogenne działają stymulująco nie tylko na nowotworzenie naczyń, ale również na proliferację i przeżycie samych komórek nowotworowych. Wyróżnia się autokryny wzrost nowotworu (komórki guza produkują cytokinę i odpowiadają na stymulację za jej pośrednictwem, oraz parakryny (komórki produkują cytokinę ale nie mają receptora, natomiast wysoką ekspresję receptora wykazują komórki śródbłonna uczestniczące w procesie angiogenezy).

Mimo ustalenia wielu nowych czynników prognostycznych, rokowanie dotyczące indywidualnego pacjenta z AML pozostaje trudne. Nadal istnieje potrzeba identyfikacji nowych czynników, umożliwiających precyzyjne przewidywanie przebiegu choroby. Wydaje się, że niektóre parametry angiogenezy mogą okazać się takimi czynnikami. Być może mogą również mieć znaczenie przy przewidywaniu wrażliwości komórek AML na chemioterapię. Rola angiogenezy w patogenezie AML i wpływie na rokowanie u pacjentów z tym rodzajem białaczki jest ciągle przedmiotem dyskusji. Wciąż wiele pytań pozostaje bez odpowiedzi, a wyniki badań są kontrowersyjne. Wybór tematu pracy doktorskiej przez lek. Olgę Dobrzyńską jest w pełni uzasadniony i dotyczy bardzo ważnego i aktualnego zagadnienia zarówno pod względem praktycznym, jak i naukowym.

Przedstawiona do oceny praca ma układ typowy dla rozpraw doktorskich. Liczy ogółem 92 strony i zawiera 178 pozycji piśmiennictwa, z których znakomita większość pochodzi z renomowanych czasopism zagranicznych i była opublikowana w ostatnich latach. Napisana jest poprawnym językiem i dobrze przygotowana pod względem edytorskim. Tekst uzupełniony jest 25 tabelami i 5 rycinami i 22 wykresami. Zamieszczony w pracy wykaz skrótów ułatwia rozumienie tekstu.

W liczącym 28 stron „Wstępie” Doktorantka szczegółowo i w oparciu o najnowsze piśmiennictwo omawia etiopatogenezę, czynniki prognostyczne oraz terapię AML. Wiele miejsca poświęca również na opis mechanizmów angiogenezy i cząsteczek zaangażowanych w ten proces, ze szczególnym uwzględnieniem badanych: EGFL7 (czynnik wzrostu naskórka podobny do domeny 7), HIF-1alfa (czynnik indukowany niedotlenieniem) i Ob-R 9receptor leptyny). „Wstęp” jest zrozumiałym i logicznym wprowadzeniem do przedstawienia założeń i celów pracy.

Podstawowym celem przedstawionych badań była ocena ekspresji EGFL7, HIF-1 $\alpha$ , Ob-R mRNA u pacjentów z rozpoznaną de novo ostrą białaczką szpikową oraz zbadanie zależności między ekspresją wybranych czynników proangiogennych, a podtypem białaczki, klasycznymi czynnikami ryzyka, parametrami molekularnymi i cytogenetycznymi, a także uzyskanymi wynikami leczenia ( odsetkiem całkowitych remisji; CR, czasem wolnym od nawrotu choroby; RFS oraz całkowitym czasem przeżycia; OS).

Dla zrealizowania założonych celów pracy Doktorantka zastosowała właściwe metody badawcze. Zostały one dokładnie opisane w liczącym 5 stron rozdziale „Materiały i metody”. Uzyskane wyniki Doktorantka poddała analizie statystycznej za pomocą odpowiednio dobranych metod statystycznych.

Materiał do badań stanowiły komórki jednojądrzaste izolowane ze szpiku 103 chorych z rozpoznaną de novo AML. Grupę kontrolną stanowiło 20 zdrowych osób: 8 kobiet i 12 mężczyzn, w wieku od 22 do 76 lat.

Doktorantka wykazała znamienne wyższą ekspresję EGFL7 mRNA w szpiku wszystkich chorych na AML, w porównaniu do grupy kontrolnej. Istotnie niższy poziom EGFL7 wykazano w przypadku ostrych białaczek szpikowych o najwyższym stopniu dojrzałości komórek blastycznych w porównaniu do AML CD34+. Nie obserwowano znamiennej statystycznie różnicy poziomu ekspresji EGFL7 w zależności od ryzyka cytogenetycznego. Natomiast w grupie chorych z obecnością postaci wild-type genu FLT3 oraz genu NPM1 stwierdzono istotnie wyższą ekspresję EGFL7. Nie wykazano znamienych różnic w poziomie mRNA EGFL7 w zależności od uzyskania remisji całkowitej. Nie stwierdzono również wpływu ekspresji na RFS i OS.

Stwierdzono znamienne niższy poziom HIF-1 $\alpha$  mRNA w AML niż w grupie kontrolnej. Ekspresja była istotnie wyższa w przypadku AML CD34+ niż w AML CD34- i wyraźnie korelowała ze stopniem dojrzałości blastów. Najwyższą ekspresję HIF-1 $\alpha$  obserwowano w grupie chorych o wysokim ryzyku cytogenetycznym. Istotnie wyższy poziom ekspresji HIF-1 $\alpha$  mRNA wykazano w białaczkach

z obecnością postaci wild-type genów FLT3 i NPM1 niż w przypadku obecności zmutowanych form genów. Zaobserwowano także niższą ekspresję HIF-1 $\alpha$  u chorych, którzy uzyskali CR po leczeniu indukcyjnym, w porównaniu do pacjentów nieodpowiadających na terapię. W grupie powyżej 60 roku życia poziom HIF-1 $\alpha$  mRNA był wyższy niż u chorych młodszych. Nie wykazano zależności między poziomem ekspresji HIF-1 $\alpha$ , a RFS. Analiza jednoczynnikowa wykazała, że stężenie HIF-1 $\alpha$ , wiek, uzyskanie CR i obecność FLT3mut są czynnikami istotnie wpływającymi na przeżycie, natomiast w analizie wieloczynnikowej jedynym niezależnym czynnikiem prognostycznym jest CR.

W przypadku Ob-R nie stwierdzono istotnych różnic między poziomem ekspresji u chorych na AML, a grupą kontrolną. Natomiast znamienne wyższy poziom Ob-R wykazano w przypadku AML CD34+ w porównaniu do AML CD34-. Nie obserwowano istotnej korelacji między ekspresją Ob-R, a cytogenetycznymi i molekularnymi parametrami ryzyka. Znamienne niższy poziom Ob-R stwierdzono w grupie pacjentów, którzy uzyskali całkowitą remisję po terapii indukcyjnej. Nie obserwowano zależności między ekspresją Ob-R, a RFS i OS.

W omówieniu wyników Doktorantka szczegółowo omawia uzyskane dane i porównuje je z wynikami badań innych autorów. Z należytą ostrożnością interpretuje wyniki własnej pracy. Na zakończenie Doktorantka przedstawiła podsumowanie najważniejszych obserwacji i wnioski.

Po wnikliwej analizie rozprawy doktorskiej lek. Olgi Dobrzańskiej mam następujące uwagi:

1. Jediną metodą badawczą zastosowaną w pracy było oznaczenie ekspresji mRNA badanych cytokin. Warto było by rozszerzyć warsztat badawczy o oznaczenie stężenia badanych cząsteczek w surowicy oraz oznaczenie gęstości naczyń w biopatach szpiku.
2. Wykres 1 (str 43) – brak wyjaśnienia użytych skrótów: SY OS, brak podania miary czasu na osi x (miesiące?). Co oznacza OS 0%, jakie były mediany OS?
3. W omówieniu wyników (str 60) zdanie: „Wynik ten jest różny od tego uzyskanego w pracy Deeb i wsp. (162), jednak znamienne wyższa ekspresja u chorych w wieku 60 lat i powyżej tłumaczy gorsze rokowanie dla tej grupy pacjentów” - powinno brzmieć: jest dodatkowym (kolejnym) czynnikiem tłumaczącym...
4. W części „Podsumowanie i wnioski” – sformułowane wnioski są wynikami badań, a nie wnioskami. Jako wnioski można by uznać podsumowanie: „Ekspresja badanych

czynników proangiogennych jest odmienna u pacjentów z ostrą białaczką szpikową w porównaniu do osób zdrowych. Koreluje ze stopniem dojrzałości komórek białaczkowych, a niekiedy także z cytogenetycznymi i molekularnymi czynnikami ryzyka”. Brakuje wniosku dotyczącego różnic ekspresji HIF-1 $\alpha$  i Ob-R u chorych z CR i brakiem odpowiedzi.

5. Użyte w streszczeniu zdanie „Jednak w przeprowadzonej analizie wieloczynnikowej obserwowalam, że poziom HIF-1 $\alpha$ , wiek, uzyskanie CR i obecność FLT3mut są czynnikami istotnie wpływającymi na przeżycie, a jedynym niezależnym czynnikiem prognostycznym jest CR.” – zawiera sprzeczne informacje. Najprawdopodobniej autorce chodziło o stwierdzenie, że jakkolwiek w analizie jednowariancyjnej poziom HIF-1 $\alpha$ , wiek, uzyskanie CR i obecność FLT3mut wpływały istotnie na OS, to analiza wielowariancyjna wykazała tylko istotność CR.

Uwagi dodatkowe:

1. Niekonsekwentne stosowanie skrótów – po wprowadzeniu skrótu nie należy już wprowadzać w tekście pełnej nazwy
2. Użyte sformułowanie (str 17) „znakomity target” jest niepoprawne stylistycznie – znakomity cel?
3. Wielokrotnie zostało użyte sformułowanie normalny kariotyp, normalne komórki. Powinno ono brzmieć: prawidłowy kariotyp, prawidłowe komórki
4. Stwierdzenie (str 64) ...przyczyniać się do rozwoju MRD... jest niepoprawne. Powinno brzmieć: ...może skutkować dodatnią MRD.
5. Poprawne brzmienie: chory na białaczkę, a nie chory z białaczką

Powyższe uwagi nie mają wpływu na moją pozytywną ocenę rozprawy doktorskiej. Doktorantka zrealizowała założone cele pracy. Jestem przekonana, że praca doktorska lek. Olgi Dobrzyńskiej stanowi samodzielne rozwiązanie przez Nią problemu naukowego. Praca ma szereg aspektów poznawczych i stanowi podstawę do dalszych badań. Uzyskane przez Doktorantkę wyniki poszerzają wiedzę na temat udziału procesów angiogenezy w rozwoju ostrej białaczki szpikowej.

Mam zaszczyt przedstawić Radzie Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu recenzję pracy i prosić Wysoką Radę o dopuszczenie lek. med. Olgi Dobrzyńskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

5  
Prof. nadzw.  
Dr hab. n. med. JOANNA GÓRA-TYBOR  
Hematolog  
Specjalista chorób wewnętrznych  
1641413