Łódź, 24.01.2024r.

Ocena rozprawy doktorskiej lek. Jakuba Dębskiego

p.t. " Zmiany immunologiczne u chorych na nowotwory krwi i układu chłonnego pod wpływem leczenia cytostatycznego"

Przekształcenie komórki prawidłowej w komórkę nowotworową jest procesem złożonym, będącym konsekwencją uszkodzenia genów naprawy, ale także mutacji w genach, których produkty są istotne dla prawidłowego przebiegu procesów wzrostu, proliferacji, różnicowania i śmierci komórki. Istotną rolę w procesie kancerogenezy odgrywa zjawisko ucieczki stransformowanych komórek spod nadzoru immunologicznego gospodarza. Coraz lepsze zrozumienie molekularnych i komórkowych mechanizmów funkcjonowania układu immunologicznego stworzyło podstawy do rozwoju wielu strategii terapeutycznych. Znalazło to odzwierciedlenie w leczeniu nowotworów układu krwiotwórczego i chłonnego, w tym ostrych białaczek. Ostra białaczka szpikowa, będąca *de facto* heterogenną grupą chorób, w których na skutek nowotworowej transformacji komórki macierzystej dochodzi do klonalnej proliferacji i akumulacji w szpiku niedojrzałych morfologiczne oraz czynnościowo komórek blastycznych, stanowi ponad 70% wszystkich ostrych białaczek u dorosłych, natomiast ostra białaczka limfoblastyczna należy do najczęstszych nowotworów złośliwych u dzieci, stanowiąc około 80% wszystkich białaczek wieku dziecięcego. Zastosowanie terapii przeciwnowotworowej prowadzi do śmieci komórki na drodze apoptozy, nekrozy, autofagii lub innych mechanizmów, co determinuje rodzaj reakcji zapalnych, wzajemnych oddziaływań układu immunologicznego i nowotworu oraz rodzaj wydzielanych cytokin. Ogólnoustrojowym efektem działania cytostatyków jest zwiększenie odsetka krążących komórek NK, cytotoksycznych limfocytów T, komórek dendrytycznych, wzrost ekspresji receptorów FAS/CD95 i TRAIL jak również zwiększenie ekspresji lub prezentacji na komórkach nowotworowych antygenów związanych z nowotworem (TAA). Uważa się, że podczas śmierci komórki dochodzi do wytwarzania cytokin lub chemokin poprzez rozpoznawanie wewnątrzkomórkowych, jądrowych, metabolicznych lub uwalnianych zewnątrzkomórkowo molekularnych wzorców związanych z uszkodzeniami tzw. DAMPs (damage-associated molecular patterns) za pomocą receptorów rozpoznających te wzorce. Wśród DAMPs

wyróżniono m.in. anneksynę I, trójfosforan adenozyny (ATP), białko HMGB1, białka histonowe, kalretikulinę (CALR), białka szoku cieplnego, a induktorami immunogennej śmierci komórki są m.in. antybiotyki antracyklinowe.

W badaniach *in vitro* wykazano istnienie kilku różnych modeli śmierci komórki, w tym tolerogenną (TCD), immunogenną (ICD) i zapalną. Nie ma jednak dotychczas jednoznacznych dowodów odnośnie wpływu ICD na czas przeżycia chorych poddanych chemioterapii, zarówno w nowotworach hematologicznych, jak i w guzach litych. W układzie immunologicznym istotną rolę pełnią limfocyty T regulatorowe (Treg) odpowiedzialne za tłumienie nadmiernej odpowiedzi immunologicznej, przyczyniając się tym samym do utrzymania homeostazy układu odpornościowego. Są to komórki o fenotypie CD4+CD25+FOXP3+, powstałe w obwodowych narządach limfatycznych oraz komórki CD4+CD25-FOXP3+ wywodzące się z grasicy. Istnieje jednak stosunkowo niewiele doniesień dotyczących roli limfocytów Treg u chorych na ostre białaczki.

Podjęcie przez **lek. Jakuba Dębskiego** badań dotyczących roli wczesnych mechanizmów odpowiedzi immunologicznej w uzyskaniu remisji u chorych na ostre białaczki, u których zastosowano chemioterapię indukującą remisję, opartą na schematach zawierających antacykliny jest więc w pełni uzasadnione. Badaniom poddano białka – kalretikulinę (CARL), HMGB1, CD47 oraz limfocyty Treg. Biorąc pod uwagę niewątpliwy wpływ chemioterapii na układ immunologiczny, analiza wymienionych powyżej białek i ocena ich wpływu na czas uzyskania remisji i przeżycie chorych może przyczynić się do ustalenia nowych czynników predykcyjnych w ostrych białaczkach, jak również do lepszego poznania związku pomiędzy tymi parametrami, a ryzykiem cytogenetycznym. Badania te mają więc charakter poznawczy, a w przyszłości być może także będą miały implikacje kliniczne.

Przedłożona mi do oceny rozprawa doktorska **lek. Jakuba Dębskiego** p.t. **"Zmiany immunologiczne u chorych na nowotwory krwi i układu chłonnego pod wpływem leczenia cytostatycznego"** liczy 176 stron maszynopisu i ma typowy dla rozpraw doktorskich układ, składając się ze spisu treści oraz rozdziałów zatytułowanych: Wstęp, Cel pracy, Pacjenci, materiały i metody, Wyniki badań, Omówienie wyników badań i dyskusja, Wnioski, Piśmiennictwo oraz Streszczenie w języku polskim i angielskim. Całość uzupełniona jest alfabetycznym wykazem skrótów używanych w tekście oraz spisem 26 rycin i 99 tabel, które ułatwiają zapoznanie się z treścią pracy.

W rozdziale p.t. „Wstęp" Doktorant omówił zarys historii diagnostyki i terapii ostrych białaczek, a następnie etiopatogenezę, rozpoznanie oraz klasyfikacje ostrych białaczek szpikowych (AML) i ostrej białaczki limfoblastycznej (ALL). Kolejne podrozdziały

poświęcone są wpływowi chemioterapii na układ immunologiczny, rodzajom śmierci komórki w wyniku zastosowanej terapii przeciwnowotworowej oraz charakterystyce limfocytów Treg. Rozdział ten świadczy o dobrym przygotowaniu teoretycznym Doktoranta do poruszania się w trudnych zagadnieniach immunologicznych i molekularnych i umiejętności łączenia ich z problemami klinicznymi. Autor wykazał się ponadto umiejętnością krytycznego korzystania z piśmiennictwa naukowego. Słusznie postanowił ustalić korelacje pomiędzy zwiększeniem odsetka limfocytów Treg we krwi obwodowej chorych na ostre białaczki przed rozpoczęciem chemioterapii, a całkowitym czasem przeżycia i odpowiedzią na leczenie. Dane literaturowe dotyczące znaczenia rokowniczego Treg w omawianej chorobie są bowiem niejednoznaczne. Uwagi, które mam do tej części pracy to odniesienie do klasyfikacji FAB i WHO 2016, podczas gdy w roku 2022 zostały opublikowane zmodyfikowane klasyfikacje takie jak WHO 5-ta edycja oraz międzynarodowa klasyfikacja konsensusowa (ICC 2022). Pacjenci włączeni do badań byli klasyfikowani jeszcze wg systemów obowiązujących przed rokiem 2022, ale przedstawienie najnowszych klasyfikacji przyczyniłoby się niewątpliwie do jeszcze większego podniesienia wartości tej pracy. W tekście nie znalazłam ponadto odniesienia do Tabeli 10 (str. 37).

W rozdziale „Cel pracy" **lek. Jakub Dębski** przedstawił cel badawczy, którym było zbadanie udziału wczesnych mechanizmów immunologicznych w osiągnięciu remisji u chorych na AML i ALL, u których zastosowano chemioterapię indukującą remisję, opartą na antaracyklinach. Autor postawił 6 pytań, na które stara się odpowiedzieć w rozdziale zatytułowanym „Omówienie wyników i dyskusja". Cel ten jest nowatorski oraz istotny z punktu widzenia poznawczego, a także klinicznego. Niewątpliwym nowatorstwem pracy była próba oceny związku pomiędzy czasem całkowitego przeżycia chorych na ostre białaczki, a badanymi parametrami, szczególnie CARL, której mutację uznaje się ostatnio jako kluczową w patogenezie nowotworów mieloproliferacyjnych *BCR-ABL* ujemnych. Temat ten jest bardzo istotny klinicznie.

W rozdziale „Pacjenci, materiał i metody" Doktorant omówił zastosowane metody badawcze, wśród których zalazły się badania z wykorzystaniem techniki cytometrii przepływowej, takie jak pomiar błonowej ekspresji CARL i białka CD47 na komórkach blastycznych CD34+ krwi obwodowej chorych na ostre białaczki przed i po podaniu chemioterapii, identyfikacja fenotypowa populacji Treg CD4+CD25+ przed i po zastosowaniu chemioterapii u chorych na AML, a także pomiar osoczowego stężenia białka HMGB1 metodą immunoenzymatyczną ELISA. Materiał do badań stanowiła krew obwodowa uzyskana od 47 chorych na AML i od 5 chorych na ALL, pobierana podczas rutynowych procedur diagnostycznych i terapeutycznych. Dobór zastosowanych metod badawczych, jak również

analiz bioinformatycznych i statystycznych nie budzi zastrzeżeń. Jest on adekwatny do postawionych celów, a ich opis świadczy o dobrym opanowaniu przez Doktoranta warsztatu badawczego. Moja drobna uwaga dotyczy niefortunnego moim zdaniem sformułowania „Dla wszystkich grup zostały wyliczone liczba przypadków (N), średnia itd.....(str 55). Rozumiem, że Autorowi chodziło o to, że „ dla wszystkich oznaczeń podano liczbę próbek wziętych do analizy".

Rozdział zatytułowany „Wyniki badań" Doktorant rozpoczął prezentacją charakterystyki klinicznej badanych grup chorych, z uwzględnieniem ryzyka cytogenetyczno-molekularnego oraz w zależności od osiągnięcia remisji po leczeniu indukującym. W mojej opinii dane te powinny się raczej znaleźć w rozdziale „Pacjenci, materiały i metody". Ponadto brakuje informacji na podstawie jakich zaburzeń cytogenetyczno-molekularnych chorzy byli zakwalifikowani do poszczególnych grup ryzyka: korzystnego, pośredniego-1, pośredniego -2 czy niekorzystnego. Uzyskane wyniki Doktorant przedstawił zarówno opisowo, jak i w formie czytelnych tabel i rycin. Autor analizował kolejno ekspresję CARL u chorych na AML skategoryzowanych wg uzyskanej odpowiedzi na chemioterapię indukującą remisję. Analiza dotyczyła wyników dokonanych przed i po podaniu chemioterapii w grupie wszystkich chorych na AML, w grupie chorych, którzy osiągnęli całkowitą remisję (CR) i w grupie chorych, u których leczenie indukujące remisję było nieskuteczne (NCR). Następnie Autor porównał ekspresję CARL oznaczaną przed chemioterapią, po podaniu chemioterapii oraz zmianę ekspresji CARL pod wpływem chemioterapii w zależności od osiągnięcia remisji. Wykazał dodatnią korelację pomiędzy stężeniem CARL przed i po chemioterapii, ocenianą zarówno w grupie wszystkich chorych, jak i w grupach pacjentów, którzy osiągnęli CR, oraz którzy nie odpowiedzieli na leczenie indukujące. W odniesieniu do chorych na ALL Doktorant przedstawił jedynie wyniki ekspresji CARL przed i po podaniu chemioterapii oraz zestawił wyniki ekspresji CARL w grupach chorych na AML i ALL zarówno przed-, jak i po podaniu chemioterapii. Ze względu na małą liczebność chorych na ALL (zaledwie 5 pacjentów) Autor nie dokonał analizy statystycznej uzyskanych wyników, co świadczy o Jego dojrzałości naukowej i świadomości ograniczeń metodologicznych badań. Przy przygotowywaniu wyników badań do publikacji proponuję zrezygnować z porównania wartości badanych parametrów oznaczanych po leczeniu pomiędzy grupą z remisją i grupą bez remisji. Na wartość danego parametru po leczeniu wpływa bowiem zarówno efekt leczenia, jak i jego wartość wyjściowa, dlatego też interpretacja takich porównań jest bardzo trudna. Ocena wpływu chemioterapii poprzez obliczenie zmiany wartości danego wskaźnika jest w mojej opinii wystarczająca.

Kolejne analizy dotyczyły ekspresji CARL u chorych na AML podzielonych wg wyjściowego ryzyka cytogenetycznego. Autor wykazał statystycznie istotnie niższe wartości ekspresji CARL oznaczanej przed wdrożeniem chemioterapii u chorych na AML z grupy korzystnego niż podwyższonego ryzyka (pośredniego i wysokiego). Krzywa przeżycia Kaplana-Meiera estymowana względem ryzyka cytogenetycznego wykazała znamiennie dłuższe przeżycie w grupie chorych korzystnego ryzyka niż w grupie podwyższonego i wysokiego ryzyka ($p=0,0126$).

Doktorant dokonał także analizy ekspresji CARL u chorych na AML skategoryzowanych wg całkowitego czasu przeżycia. Porównał ekspresję CARL przed podaniem chemioterapii oraz po podaniu chemioterapii, w grupie chorych, którzy żyli do końca okresu obserwacji, oraz w grupie zmarłych podczas tego okresu. Wyższa ekspresja CARL zarówno przed, jak i po podaniu chemioterapii była charakterystyczna dla osób zmarłych podczas okresu obserwacji. Autor wykonał także analizę wieloczynnikową Coxa dla CARL i ryzyka cytogenetycznego w badanej populacji chorych na AML, jak również ocenił korelację ekspresji CARL z czasem całkowitego przeżycia w grupie wszystkich chorych na AML, w grupie chorych, którzy osiągnęli CR oraz u pacjentów z AML, u których leczenie indukujące remisję było nieskuteczne.

U chorych na AML Doktorant dokonał także podobnych analiz jak opisane powyżej dla CD47 oraz białka HMGB1. Ze względu ma małą liczebność chorych na ALL, analiz statystycznych w tej grupie nie wykonano.

Kolejnym etapem badań była ocena odsetka limfocytów Treg u chorych na AML skategoryzowanych wg uzyskanej odpowiedzi na chemioterapię oraz wg czasu całkowitego przeżycia, jak również ocena wzajemnych korelacji ekspresji białek i odsetka limfocytów w określonych punktach czasowych. Kolejność prezentacji wyników jest logiczna, czytelna i zgodna z postawionymi celami pracy.

W rozdziale „Omówienie wyników i dyskusja" Doktorant omówił uzyskane wyniki w szeroko zakreślonym kontekście danych literaturowych, poświęconych badanemu zagadnieniu oraz przedstawił ich własną interpretację. Uzyskane wyniki Doktorant analizował w sposób ostrożny i wyważony. Autor odnosił się do wyników oznaczanych parametrów (CARL, CD47, białka HMGB1 oraz limfocytów Treg) wykonanych u chorych na AML. Ze względu na małą liczebność chorych na ALL, Autor słusznie nie przeprowadził analiz statystycznych w tej grupie badanych, co jak podkreślam świadczy o Jego krytycyzmie i profesjonalizmie naukowym.

W rozdziale „Wnioski" Doktorant przedstawił 6 wniosków logicznie wynikających z uzyskanych wyników i odpowiadających postawionym celom pracy. Szczególnie istotnym z klinicznego punku widzenia może być wniosek 5, w którym Doktorant podkreśla, iż „ekspresja CARL ≥ 20% po podaniu antracyklin determinuje krótszy czas całkowitego przeżycia u chorych na AML i jako niezależny czynnik niekorzystnego rokowania może być atrakcyjnym celem dla immunoterapii CAR-T". Użyłabym tylko ostrożniejszego sformułowania „wpływa na skrócenie czasu…: zamiast „determinuje", bo ekspresja CARL nie jest jedynym czynnikiem skracającym czas przeżycia w ostrych białaczkach.

Rozprawę kończy Spis 245 pozycji piśmiennictwa ułożonych w kolejności cytowań, właściwie dobranych i prawidłowo cytowanych, streszczenie w języku polskim i angielskim oraz Wykaz rycin i tabel zamieszczonych w tekście.

Podsumowując stwierdzam, że przedłożona mi do oceny rozprawa doktorska **lek. Jakuba Dębskiego** p.t. **"Zmiany immunologiczne u chorych na nowotwory krwi i układu chłonnego pod wpływem leczenia cytostatycznego"** spełnia wszystkie ustawowe i zwyczajowe wymogi stawiane rozprawie na stopień naukowy doktora nauk medycznych. Przedstawione powyżej uwagi, poczynione z obowiązku recenzenta, nie mają charakteru zarzutów merytorycznych i w żadnym stopniu nie umniejszają mojej pozytywnej opinii na temat pracy, w której połączono aspekty kliniczne z badaniami z zakresu immunologii i biologii komórkowej, zagadnieniami bardzo istotnymi obecnie w wielu dziedzinach medycyny. Praca napisana ładnym językiem, w sposób przejrzysty, stanowi oryginalne rozwiązanie przez Doktoranta zagadnienia, w którym Autor wykazał się wiedzą teoretyczną, umiejętnością korzystania z piśmiennictwa naukowego, planowania badań naukowych i samodzielnego ich przeprowadzenia oraz tak ważnym krytycyzmem w odniesieniu do uzyskanych wyników.

Mam więc zaszczyt i przyjemność wnioskować do Wysokiej Rady Kolegium Nauk Medycznych Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu o dopuszczenie lek. Jakuba Dębskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

prof.dr hab.med. Anna Korycka-Wołowiec

Prof. dr hab. n. med.
ANNA KORYCKA-WOŁOWIEC
diagnostyka laboratoryjna