

**Ocena rozprawy doktorskiej lek. Jakuba Macieja Dębskiego pod tytułem:  
“Zmiany immunologiczne u chorych na nowotwory krwi i układu chłonnego  
pod wpływem leczenia cytostatycznego”**

Ostre białaczki należą do chorób nowotworowych układu krwiotwórczego i chłonnego, w których leczeniu indukującym wykorzystuje się chemioterapię opartą na antybiotykach antracyklinowych. W przypadku ostrej białaczki szpikowej indukcja remisji obejmuje najczęściej podanie protokołów złożonych z daunorubicyny, arabinozydu cytozyny i ewentualnie kladrybiny. Ostre białaczki limfoblastyczne leczy się w Polsce według schematów PALG, w skład których wchodzi także daunorubicyna. Na podstawie wyników ostatnich badań naukowych, dowiedziono, iż chemioterapia wywołuje nie tylko śmierć komórek nowotworowych na drodze tolerogenicznej apoptozy, ale w odpowiednich warunkach potrafi wzbudzić też korzystne reakcje immunologiczne, angażując efektorowe mechanizmy humoralne i komórkowe do walki z chorobą. Immunogenna śmierć komórki indukowana zastosowaniem antybiotyków antracyklinowych, charakteryzuje się translokacją białka kalretikuliny z obszaru retikulum endoplazmatycznego na błonę komórki blastycznej, emisją do macierzy zewnątrzkomórkowej cząsteczek DAMPs (*damage-associated molecular patterns*) takich, jak ATP, HMGB1, aneksyna A1 czy IFN typu I. Ektopowa forma kalretikuliny jest silnym sygnałem aktywującym dojrzewanie komórek dendrytycznych i fagocytozę. Ekspresja CD47 z kolei, antagonizuje aktywność kalretikuliny i stanowi ważny czynnik umożliwiający przeżycie komórek nowotworu poprzez inhibicję procesu fagocytozy. Rola limfocytów T regulatorowych nie została dotychczas dobrze poznana. W niektórych modelach nowotworów, podwyższony odsetek limfocytów T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> korelował negatywnie z przeżyciem i prawdopodobieństwem nawrotu choroby.

Stąd też:

Głównym celem pracy lek. Jakuba Macieja Dębskiego było zbadanie udziału wczesnych mechanizmów immunologicznych w osiągnięciu remisji choroby u chorych z ostrą białaczką szpikową (AML) i limfoblastyczną (ALL), u których zastosowano chemioterapię indukującą remisję opartą na antybiotykach antracyklinowych. Jako kluczowe w wymienionym procesie, wytypowano białka - kalretikulinę, CD47, HMGB1, oraz limfocyty T regulatorowe.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska obejmuje wraz ze streszczeniami, wykresami, rycinami i tabelami 178 stron wydruku komputerowego. Układ pracy przedstawiony w spisie treści jest poprawny.

We wstępie Autor szczegółowo omawia aktualny stan wiedzy na temat diagnostyki i leczenia ostrych białaczek oraz wpływ cytostatyków na układ immunologiczny człowieka. Opisuje rodzaje śmierci komórki pod wpływem leczenia przeciwnowotworowego oraz znaczenie limfocytów T regulatorowych.

W pracy postawiono następujące pytania:

- 1) Czy podanie chemioterapii indukującej remisję wpłynęło na ekspresję kalretikuliny, CD47, stężenie osocznego HMGB1 oraz odsetek limfocytów T regulatorowych po 12-24 godzinach?
- 2) Czy istnieją różnice w ekspresji kalretikuliny, CD47, stężeniu HMGB1 oraz odsetku limfocytów T regulatorowych w zależności od osiągnięcia remisji całkowitej w oznaczeniach wykonanych przed i po zastosowaniu chemioterapii?
- 3) Czy występują różnice w ekspresji kalretikuliny, CD47, stężeniu HMGB1 oraz odsetku limfocytów T regulatorowych w zależności od ryzyka cytogenetycznego?
- 4) Czy istnieje zależność pomiędzy ekspresją kalretikuliny, CD47, stężeniem HMGB1 oraz odsetkiem limfocytów T regulatorowych, w jakiej fazie choroby i leczenia?
- 5) Czy odnotowano związek pomiędzy czasem całkowitego przeżycia pacjentów a badanymi parametrami?
- 6) Czy otrzymane wyniki dowiodły istnienia mechanizmu immunogennej śmierci komórki białaczkowej po wdrożeniu chemioterapii opartej na antracyklinach w badanej populacji pacjentów?

Postawione cele pracy należy uznać za godne realizacji.

Pacjenci i metody stanowią kolejny rozdział, szczegółowo opisujący przebieg badania.

Do badań zakwalifikowano 52 chorych – 47 z rozpoznaniem AML i 5 z ALL – leczonych w Klinice Hematologii, Nowotworów Krwi i Transplantacji Szpiku we Wrocławiu w latach 2013-2017.

Na przeprowadzenie badań uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Medycznego w Wrocławiu (Nr KB – 219/2009, w załączeniu- otrzymałem). Każdy pacjent został szczegółowo poinformowany o celu i zasadach prowadzonego badania i podpisał dobrowolnie formularz świadomej zgody.

Badania odsetka ekspresji błonowej kalretikuliny i białka CD47 oraz limfocytów T regulatorowych CD4+CD25<sup>high</sup> przeprowadzono przy pomocy cytofluorymetrii przepływowej. Stężenie białka HMGB1 w surowicy chorych oceniono w immunoenzymatycznym teście fazy stałej – ELISA. Oznaczenia wykonywano przed wdrożeniem chemioterapii indukującej remisję zawierającej antracykliny oraz 12-24 godziny po jej aplikacji. Otrzymane dane zostały następnie poddane analizie statystycznej przy wykorzystaniu komputerowych pakietów programów statystycznych EPIINFO Ver. 7.2.3.1. i Statistica 13.3.

Wyniki podane są w osobnym rozdziale w formie graficznej i opisowej, pozwoliły one na sformułowanie następujących wniosków, które zostały przedstawione w sposób opisowy i stanowią w większości odpowiedzi na postawione cele pracy:

1. Podanie opartej na antracyklinach chemioterapii indukującej remisję w ostrej białaczce szpikowej może powodować zmniejszenie stężenia HMGB1 w osoczu, nie wpływa na ekspresję kalretikuliny, białka CD47 i odsetek limfocytów T regulatorowych.
2. Ekspresja kalretikuliny, CD47, stężenie HMGB1 i odsetek limfocytów T regulatorowych u chorych na AML nie różnią się w zależności od osiągnięcia lub braku remisji całkowitej choroby.
3. Zwiększoną ekspresję kalretikuliny i większe stężenie HMGB1 przed podaniem chemioterapii, wykazują chorzy na AML z podwyższonym, w porównaniu do standardowego, ryzykiem cytogenetycznym.
4. Ekspresja kalretikuliny koreluje pozytywnie z białkiem CD47 u chorych na AML, niezależnie od fazy leczenia.
5. Ekspresja kalretikuliny  $\geq 20\%$  po podaniu antracyklin determinuje krótszy czas całkowitego przeżycia chorych na AML. Jako niezależny czynnik niekorzystnego rokowania może być atrakcyjnym celem dla immunoterapii CAR-T. W grupie pacjentów z AML, którzy osiągnęli remisję całkowitą, całkowity czas przeżycia wykazuje związek z odsetkiem limfocytów T regulatorowych.
6. Nie zaobserwowano odchyień badanych parametrów reprezentatywnych dla mechanizmu immunogennej śmierci komórki wywołanej działaniem antracyklin na blasty białaczkowe.

W Omówieniu wyników i dyskusji Autor w sposób zwięzły i szczegółowy ocenia uzyskane przez siebie wyniki i porównuje je z rezultatami badań przeprowadzonych, opublikowanych przez innych lekarzy.

Piśmiennictwo jest bardzo rozbudowane, dobrane właściwie, w zdecydowanej większości pochodzi z ostatnich 10 lat.

Podsumowując ocenę rozprawy doktorskiej należy stwierdzić, że stanowi ona kolejny krok w poszukiwaniu nowych czynników prognostycznych i predykcyjnych w ostrych białaczkach i miejmy nadzieję w projektowaniu terapii u chorych na te nowotwory.

W pracy lekarz Jakub Maciej Dębski wykazał się bardzo dobrą znajomością warsztatu jakim powinien się posługiwać pracownik naukowy- lekarz. Na wyróżnienie zasługuje perfekcyjna znajomość mechanizmów prowadzących do śmierci komórki nowotworowej.

#### Wyróżniki/auty pracy

1. Oryginalną i interesującą obserwacją Doktoranta jest wykazanie istotnej statystycznie różnicy w ekspresji *ecto*-CALR w pomiarze przed podaniem chemioterapii pomiędzy grupami chorych z korzystnym i podwyższonym ryzykiem cytogenetycznym w ostrych białaczkach szpikowych. Większe wartości cechowały chorych posiadających niekorzystną rokowniczo sygnaturę genetyczną. Zwracam uwagę na fakt, że w literaturze nie ma dotychczas doniesień na temat roli *ecto*-CALR w poszczególnych grupach ryzyka ostrych białaczek szpikowych.
2. Otrzymane wyniki, dotychczas wykonanych badań wskazują na wniosek, że większa ekspresja powierzchniowa CD47, jako natywny mechanizm obronny promujący przeżycie blastów białaczkowych, równoważyła profagocytarny sygnał "*eat me*" kalretikuliny, nie doprowadzając do zainicjowania immunogennej śmierci komórki. Na tej podstawie postuluje się, że CD47 powoduje supresję funkcji kalretikuliny, zapewniając komórce nowotworowej przeżycie i chroniąc ją długofalowo przez działaniem leków cytotoksycznych. Podobne zależności prawdopodobnie zaistniały w własnych doświadczeniach Doktoranta, co tłumaczyłoby negatywny wpływ większych odsetków kalretikuliny w oznaczeniach po podaniu chemioterapii na przeżycie całkowite, a także słabą tendencję do występowania wyższych median CD47 w próbkach po zastosowaniu antracyklin. Powyższe obserwacje

wspiera również wykazany trend w postaci negatywnej korelacji większych zmian odsetków CD47 i przeżycia całkowitego.

3. Ambiwalentna rola białka HMGB1 sprawia, iż nie jest ono dobrym markerem prognozy długoterminowej w ostrej białaczce szpikowej, co wykazał Doktorant.

Z obowiązku recenzenta zwracam uwagę na:

Ograniczenie pracy:

1. brak oceny chorych na ostrą białaczkę limfoblastyczną z uwagi na małą liczebność próby niezapewniającej wiarygodności badania. Oczywiście do wykonania dalszych badań już teraz Doktoranta zachęcam.
2. Brak uwzględnienia w analizie HMGB1 wartości cytokin we krwi obwodowej i obecności infekcji bakteryjnych- elementów nieodłącznie występujących w przebiegu ostrej białaczki szpikowej i wpływających na stężenie ww. parametru.

Usterki:

1. nie stwierdzam obecności istotnych usterek

Pracę lek. Jakuba Macieja Dębskiego oceniam bardzo pozytywnie ze względu na zaprezentowany materiał oraz istotne klinicznie refleksje nad nim.

Rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 187 ust. 1-4 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (tj. Dz. U. 2018 poz. 1668).

Uważam, że lek Jakub Maciej Dębski powinien być dopuszczony do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie dziękuję za przywilej recenzowania tej pracy.