



Katedra i Zakład Toksykologii

Kierownik: prof. dr hab. Agnieszka Piwowar

Wrocław, 21.08.2020

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Adriana Krygiera zatytułowanej
„Ocena ekspresji i polimorfizmów genów, kodowanych przez nie czynniki transkrypcyjne
oraz transkryptu genu fuzyjnego RUNX1-RUNX1T1 w ostrej białaczce szpikowej”**

Praca wykonana w Pracowni Diagnostyki Molekularnej i Farmakogenomiki Zakładu Biochemii Farmaceutycznej i Diagnostyki Molekularnej, Katedry Diagnostyki Laboratoryjnej i Molekularnej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

Promotor pracy: prof. dr hab. n. farm. Ewa Balcerczak

Promotor pomocniczy: dr n. farm. Marta Żebrowska-Nawrocka

Ostra białaczka szpikowa (AML) należy do grupy chorób spowodowanych nowotworowym rozrostem w szpiku kostnym wczesnych komórek prekursorowych krwi. Stanowi ona około 80% ostrych białaczek u osób dorosłych. Dane epidemiologiczne szacują częstość występowania i częstość zgonów z powodu AML w Europie odpowiednio na 5-8 przypadków na 100 tysięcy mieszkańców oraz 4-6 przypadków na 100 tysięcy mieszkańców na rok. Dane te są jednak często niedoszacowane z uwagi na brak kompletnych i prawidłowo funkcjonujących programów rejestracji pacjentów z AML, jednak wiadomym jest, iż zapadalność na ostrą białaczkę szpikową wzrasta wraz z wiekiem (szczególnie po 70 roku życia) i częściej dotyczy mężczyzn niż kobiet. Ponadto dane kliniczne wskazują, iż nieleczona, choroba rozwija się szybko i powoduje zgon chorego w ciągu 2-3 miesięcy od momentu rozpoznania. Etiologia AML jest stosunkowo złożona, a czynniki ją wywołujące nie do końca zidentyfikowane. W ostatnich latach nastąpił znaczący postęp w badaniach diagnostycznych służących rozpoznaniu AML i identyfikacji czynników

predysponujących do jej rozwoju. Zwraca się coraz większą uwagę na rolę czynników genetycznych zarówno w patogenezie tej choroby jak i skuteczności zastosowanej terapii, co znalazło również odzwierciedlenie w aktualizowanym podziale i klasyfikacji ostrych białaczek szpikowych. Dane z piśmiennictwa wskazują również na aberracje genetyczne, które mogą mieć związek z rozwojem ostrej białaczki szpikowej czy oceną rokowania pacjentów z ALM. Mutacje występujące w genach kodujących czynniki transkrypcyjne oraz zmiany w poziomie ekspresji czy ilości produktów białkowych tych genów mogą być związane z zaburzeniami w aktywacji i przebiegu szlaków biochemicznych, a także z rozwojem wielu chorób, w tym właśnie ostrej białaczki szpikowej. Dane z piśmiennictwa potwierdzają rolę czynników transkrypcyjnych w prawidłowym przebiegu hematopoezy oraz różnicowaniu się komórek krwiotwórczych. W tym aspekcie Badanie zmian w genach kodujących czynniki transkrypcyjne z rodziny RUNX (RUNX1 oraz RUNX3) oraz geny CEBPA i c-MYC w aspekcie związku z ALM posiada ważny aspekt poznawczy.

Przedstawioną do recenzji rozprawę doktorską stanowi 214 numerowanych stron maszynopisu w typowym dla dysertacji doktorskich o charakterze doświadczalnym układzie, zawierających m.in. spis treści oraz spis użytych w pracy skrótów. Podzielona jest ona na VII rozdziałów głównych. Rozdział I stanowi wprowadzenie teoretyczne do tematu rozprawy i obejmuje 52 strony maszynopisu. Jest prawidłowo napisany, z dużą dbałością o szczegóły i stanowi dobre wprowadzenie i uzasadnianie dla podjętych badań. Zawiera panel informacji o badanej jednostce chorobowej i tak też jest zatytułowany, choć w opinii Recenzenta powinien on nosić jednak nieco inny tytuł i zostać opatrzony numerem. Rozdział ten zawiera najważniejsze informacje dotyczące epidemiologii, etiopatogenezy i objawów choroby. Ważnym elementem jest zwrócenie uwagi przez Autora na zmieniającą się klasyfikację AML. Przedstawia ponadto standardy diagnozowania oraz rozpoznawania AML. Ważnym elementem jest rozdział opisujący rokowanie u pacjentów z AML a także stosowane metody leczenia. Przedstawił także informacje dotyczące charakterystyki wybranych czynników transkrypcyjnych będących przedmiotem podjętych badań, choć w opinii Recenzenta rozdział ten również powinien być wyraźnie zaznaczony i opatrzony adekwatnym numerem. Uwaga, która nasuwa się podczas lektury tego rozdziału dotyczy Ryciny 1 i 2, gdzie zamieszczono zdjęcia pochodzące z odnośnika literaturowego, a bardziej wskazanym byłoby przedstawienie przykładowych zdjęć własnych z preparatów pochodzących od osób zdrowych oraz chorych. Ponadto w podrozdziale pt. „Czynniki molekularne transformacji nowotworowej”, w którym wymienione są jedynie te czynniki, dobrym uzupełnieniem byłoby choć ich krótkie opisanie. Inne uwagi nasuwające się podczas czytania tego rozdziału oraz całej pracy dotyczą m.in. często braku podania w tekście pracy informacji opisujących, co przedstawia dana rycina czy tabela. Ogólną uwagą odnoszącą się również do całego tekstu pracy jest sposób opisu tabel, który powinien być zamieszczony nad tabelą, jak to jest ogólnie przyjęte w pracach naukowych, a nie pod tabelą. Ponadto skróty należy wyjaśniać przy pierwszym ich pojawianiu się w tekście. W odniesieniu do zamieszczonego wykazu skrótów wskazanym byłoby uporządkowanie alfabetyczne użytych skrótów, co znacząco ułatwiłoby ich wykorzystanie w trakcie lektury Dysertacji.

Ponadto Recenzent dopatrzył się pewnego braku konsekwencji w wyjaśnianiu użytych skrótów zarówno w języku polskim jak i angielskim.

Rozdział II zawiera „Cel pracy”, w którym to Pan magister w sposób właściwy i klarowny sformułował jeden cel główny oraz określił cele szczegółowe. Jak podaje Doktorant, celem niniejszej rozprawy była ocena polimorfizmów, poziomów ekspresji oraz obecności produktów białkowych genów, kodujących czynniki transkrypcyjne, potencjalnie zaangażowane w leukemogenezę oraz patogenezę AML. Analizę przeprowadzono na trzech poziomach molekularnych: oceniając DNA, RNA oraz produkty białkowe, jednak nie dla wszystkich czynników taka analiza została dokonana, co powinno być wyjaśnione i uzasadnione w tekście pracy. Jak podaje Pan magister, analizę genu RUNX1 przeprowadzono na dwóch poziomach molekularnych (oceniając DNA i RNA), a genu RUNX3 na trzech poziomach molekularnych (DNA, RNA oraz białko), genu CEBPA na dwóch poziomach, a genu c-MYC jedynie na poziomie mRNA. W tej części pracy umieszczono również rozdział „Materiały i metody”, w którym Doktorant opisuje materiał biologiczny wykorzystany do badań oraz bardzo dobrze przedstawia zastosowane metody badawcze. Doktorant samodzielnie wyizolował materiał genetyczny z próbek krwi do oceny polimorfizmów pojedynczych nukleotydów badanych genów i oceny poziomu ich ekspresji. Wykorzystał reakcję łańcuchowej polimerazy, reakcję odwrotnej transkrypcji, reakcję PCR w czasie rzeczywistym, technikę polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych, elektroforezę w żelu agarozowym oraz metodę Western-Blot. Wszystkie one zostały właściwie dobrane dla realizacji założonych celów badawczych i zwięźle opisane. Wskazuje to na bardzo dobrą orientację Pana magistra w zakresie metodyki niezbędnej dla realizacji postawionych sobie celów badawczych i opanowanie tych technik. Bardzo dobrym uzupełnieniem dla zobrazowania wykonywanych badań są zamieszczone w pracy schematy blokowe. Rozdział ten zawiera również informacje dotyczące zastosowanych metod analizy statystycznej, które są odpowiednie dobrane dla analizy uzyskanych wyników, co wskazuje na dużą biegłość Doktoranta w tym zakresie. Uwagi, które nasunęły się podczas czytania tej części pracy dotyczą m.in. tytułów nagłówków podrozdziałów 10.2.2, 10.2.8 i 10.2.9, które powinny być doprecyzowane. W opinii Recenzenta powinno się także unikać takich określeń jak: „próbki zwirowano” lub „zworteksowano”, a ponadto wskazanym byłoby podanie w jakich warunkach te czynności wykonano (obroty, nazwa aparatu). Inne uwagi dotyczą takich określeń jak „dla drobin komórkowych” (str 79) czy „czystą jałową wodę” (str 92).

W Rozdziale III Doktorant bardzo spójnie i logicznie przedstawił uzyskane wyniki z przeprowadzonych badań. Zostały one przejrzysto udokumentowane na 30 wykresach i 15 rycinach oraz w 14 tabelach, wraz z analizą statystyczną, co zwiększa ich czytelność i znacząco ułatwia zorientowanie się w istocie zaobserwowanych zmian. W rozdziale tym Doktorant bardzo słusznie pogrupował wyniki przeprowadzonych badań w kolejnych, logicznie układających się podrozdziałach, co potwierdza Jego umiejętności do właściwego zaplanowania panelu badań, konsekwentnego ich realizowania i właściwego zobrazowania. Dokonana analiza statystyczna obiektywizuje poczynione przez Doktoranta obserwacje, a dobór zastosowanych metod i testów statystycznych wskazuje na zrozumienie charakteru obserwowanych

zmian w badanych grupach chorych i osób zdrowych. Pan magister zestawił kolejno: wyniki genotypowania polimorfizmu rs2268277 genu RUNX1 oraz polimorfizmu rs6672420 genu RUNX3 i ekspresji tych genów u osób chorych na AML w stosunku do grupy kontrolnej oraz przeanalizował je także w odniesieniu do danych demograficznych, takich jak płeć badanych osób i wiek w momencie rozpoznania choroby oraz, co szczególnie ważne, danych kliniczno-patologicznych pacjentów z AML zgodnie z klasyfikacją FAB. Bardzo interesująca jest dokonana ocena uzyskanych wyników w aspekcie czasu przeżycia chorych w trakcie 3-letniego okresu obserwacji, co ma szczególną wartość prognostyczną. Taką analizę przeprowadzono również w odniesieniu do genów CEBPA i c-MYC. W kolejnych podrozdziałach tej części pracy Doktorant dokonał analizy ilościowej względnego poziomu ekspresji wybranych genów i również odniósł je do danych demograficznych oraz kliniczno-patologicznych pacjentów z AML oraz wieku pacjentów w momencie rozpoznania choroby i czasu przeżycia chorych. Dokonał również oceny obecności i ekspresji genu fuzyjnego RUNX1/RUNX1T1, którą stwierdził jedynie u 2 pacjentów z AML, co mimo ważności poczynionej obserwacji niestety uniemożliwia wnioskowanie statystyczne. Przeprowadził również ocenę związku między występowaniem poszczególnych genotypów oraz alleli polimorfizmów rs2268277 RUNX1 i rs6672420 RUNX3, a względnym poziomem ekspresji tych genów. Ostatni podrozdział tej części pracy zawiera wyniki analizy jakościowej białek RUNX3 i CEBPA techniką Western Blot. Ogólna uwaga Recenzenta do tej części Dysertacji dotyczy używania przez Pana magistra określenia „zależność” w tabelach czy na wykresach (np. str 108, 109, 125, 145 i inne), gdzie przedstawione są różnice w wartościach badanych parametrów między wyodrębnionymi podgrupami, a nie wyniki analizy korelacji. Ponadto należałoby doprecyzować w jakiej postaci, wartości mediany czy średniej, przedstawiane są wyniki w danej tabeli (np. str 121, 132). Pewne zastrzeżenie budzi użycie określenia „o prawidłowym doborze obu kohort” (str 101), które wydaje się nieco na wyrost w stosunku do 46 przebadanych osób chorych. Doprecyzowania wymaga również opis tabeli 25, gdzie wskazany jest związek uzyskanych wyników z wiekiem, a tabela takich danych nie zawiera. Dobrym zobrazowaniem wyników jest ich przedstawienie jako log₁₀ względnego poziomu ekspresji genów (str 122), co pozwala na lepszą interpretację wyników. Ciekawym było dokonanie analizy Western Blott w 18 próbkach materiału biologicznego, innych niż te, w których badano polimorfizmy i ekspresję wybranych genów, jednak szkoda, iż Doktorant nie dysponował danymi kliniczno-patologicznymi dla tych pacjentów. Również bardzo interesująca jest ocena ekspresji genu fuzyjnego RUNX1/RUNX1T1 oraz odniesienie do obecności tego genu potwierdzoną metodą FISH u chorych, co pozwala na dokładne zidentyfikowanie próbek pacjentów i jest pomocne w ocenie wyników prawdziwie dodatnich i fałszywie ujemnych (str 143). Z uwagi na zbyt małą liczbę pacjentów nie można przeprowadzić pełnego wnioskowania statystycznego, a jedynie obserwować tendencje. Recenzent zdaje sobie sprawę z trudności związanych z pozyskaniem materiału biologicznego do badań, a szczególnie pochodzącego od jednorodnej grupy chorych. Wskazanym byłoby zwiększenie grupy pacjentów i kontynuacja badań, gdyż przykładowo, wniosek dziewiąty, mówiący, iż obecność genu fuzyjnego RUNX1/RUNX1T1 u pacjentów z AML jest korzystnym czynnikiem rokowniczym, wysunięty na podstawie pojedynczych wyników.

Uzyskane wyniki zostały przeanalizowane w ramach wnikliwej dyskusji, którą Autor zawarł w Rozdziale IV, gdzie na 18 stronach maszynopisu w oparciu o właściwie dobrane bogate dane literaturowe. W przeprowadzonej w tym rozdziale analizie i interpretacji uzyskanych wyników Pan magister wykazał się dużą znajomością tematu i umiejętnością samodzielnej, krytycznej oceny własnych wyników w odniesieniu do danych opublikowanych przez innych autorów. Przeprowadzona dyskusja świadczy o doskonałym merytorycznym przygotowaniu Doktoranta do pracy naukowej. Wielopłaszczyznowa analiza wyników pozwoliła Panu magistrowi na sformułowanie 10 trafnych i ważnych wniosków.

Doktorant zaobserwował, iż obecność polimorfizmu rs2268277 genu RUNX1 nie jest związana ze zwiększonym ryzykiem rozwoju AML, a obecność genotypu GC wiąże się z wyższym wiekiem w momencie rozpoznania choroby, co jest ważną obserwacją wskazującą na późniejsze występowanie objawów chorobowych. Równie ważne jest stwierdzenie statystycznie istotnego podwyższonego poziomu ekspresji genu RUNX3 u chorych z krótszym czasem przeżycia w okresie trwania 3-letniej obserwacji, co jak wskazuje Pan magister, może być związane z gorszym rokowaniem oraz wyższym wskaźnikiem śmiertelności wśród pacjentów z AML. Analiza poziomów transkryptów pozostałych dwóch genów - CEBPA oraz c-MYC wskazała na brak związku pomiędzy poziomem ekspresji tych genów, a rozwojem i przebiegiem AML. Z kolei, co interesujące, stwierdzenie obecności genu fuzyjnego RUNX1/RUNX1T1 u chorych na AML wskazuje na jego rolę jako korzystnego czynnika rokowniczego, jednak wymaga to dalszych badań na większej liczbie chorych. Ciekawą obserwacją jest stwierdzenie niskiego stężenia białka CEBPA oraz obecności białka RUNX3 jedynie u 3 pacjentów, co pokazuje, iż ekspresja tych białek we krwi chorych z AML jest obniżona. Jak bardzo słusznie i dojrzałe zauważą Doktorant - przeprowadzone badania i analizy mogą stanowić wstęp do przeprowadzenia dalszych badań dotyczących oceny roli czynników transkrypcyjnych w rozwoju oraz przebiegu ostrej białaczki szpikowej, a także w poszukiwaniu nowych biomarkerów tej choroby,

Ostatnie rozdziały Dysertacji zawierają streszczenie w języku polskim i angielskim (Rozdział V) oraz wykaz piśmiennictwa, spis tabel, rycin i wykresów (Rozdział VI). Według podanych w Rozdziale VI danych w pracy zamieszczono 32 tabele, 38 rycin i 30 wykresów, co bogato ilustruje Dysertację i obrazuje wniesiony przez Doktoranta nakład pracy. W rozdziale tym zawarto także spis piśmiennictwa, gdzie Autor wykorzystał aż 227 pozycji literaturowych, pochodzących w większości (128 odnośników) z ostatnich 10 lat, uporządkowanych w sposób alfabetyczny i właściwie cytowanych w treści pracy. Wskazanym byłoby podanie zakresu stron, czy rozdziałów z monografii, które wykorzystano w trakcie pisania Dysertacji. Recenzent dopatrył się także pewnej niekonsekwencji w sposobie zapisu wykorzystanego piśmiennictwa, co należałoby ujednotwić. W „Streszczeniu” zawartym w Rozdziale V pracy, Autor słusznie konkluduje, iż poznanie funkcji oraz pełnej charakterystyki genów z rodziny RUNX oraz genów CEBPA oraz c-MYC w grupie pacjentów z ostrą białaczką szpikową może być szczególnie pomocne w ocenie rokowania tej choroby. Może przełożyć się to na opracowanie nowych celowanych strategii leczniczych oraz zwiększenie skuteczności leczenia u pacjentów z ostrą białaczką szpikową. Stanowi to kwintesencję przeprowadzonych badań i potwierdza ważność uzyskanych wyników.

Rozdział VII stanowi uzupełnienie Dysertacji, gdyż zawiera informacje o publikacjach (8) oraz komunikatach zjazdowych (aż 18), których Pan magister jest współautorem oraz uzyskane przez Niego nagrody i wyróżnienia, co wskazuje na dużą aktywność naukową Doktoranta. Do dysertacji dołączone jest ponadto stosowne *Oświadczenie*, iż Pan magister jest wyłącznym twórcą przedłożonej do oceny rozprawy.

Reasumując, przedłożoną do recenzji rozprawę doktorską oceniam pozytywnie i bardzo wysoko. Pan mgr Adrian Krygier wykazał się dużą dojrzałością naukową w zakresie podjętego tematu badawczego prawidłowo wytyczając sobie cele badawcze i właściwie projektując badania służące ich realizacji. Przeprowadził wnikliwą analizę uzyskanych wyników, bardzo rozważnie je zinterpretował i odniósł do danych z piśmiennictwa światowego prowadząc wyważoną i merytoryczną dyskusję opartą na aktualnych danych literaturowych. W opracowaniu Dysertacji, zarówno jej części teoretycznej jak i praktycznej wykazał się umiejętnością właściwego doboru piśmiennictwa. Wykazał się zdolnością formułowania krótkich i logicznych podsumowujących pracę wniosków oraz umiejętnością przejrzystego i logicznego streszczenia założeń pracy i zrealizowanych celów. Przeprowadzone przez Pana magistra badania mają nie tylko istotny aspekt poznawczy ale także kliniczny, co znacząco podnosi wartość naukową uzyskanych wyników. Z całym przekonaniem upoważnia mnie to do pozytywnego zaopiniowania niniejszej Dysertacji.

Wniosek końcowy: przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska opatrzona tytułem „Ocena ekspresji i polimorfizmów genów, kodowanych przez nie czynników transkrypcyjnych oraz transkryptu genu fuzyjnego RUNX1-RUNX1T1 w ostrej białaczce szpikowej” jest oryginalnym dorobkiem badawczym Pana mgr Adriana Krygiera i spełnia wszystkie wymogi stawiane rozprawom doktorskim w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003r. "O stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki" (Dz. U. Nr 65, poz 595 z późniejszymi zmianami) i świadczy o dobrym przygotowaniu Doktoranta do prowadzenia pracy naukowej. Z pełnym przekonaniem przedkładam zatem Przewodniczącej Rady Nauk Farmaceutycznych Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, wniosek o dopuszczenie Pana mgr Adriana Krygiera do dalszych etapów przewodu doktorskiego oraz wnoszę o wyróżnienie niniejszej Rozprawy doktorskiej.

Z poważaniem

prof. dr hab. n. farm. Agnieszka Piwowar