

Warszawa, dnia 10.11.2019

Prof. dr hab. med. Krzysztof Jamroziak  
Klinika Hematologii  
Instytut Hematologii i Transfuzjologii w Warszawie  
ul. Indiry Gandhi 14,  
02-776 Warszawa

### OCENA

rozprawy doktorskiej mgr Jacka Pietrzaka pt.: "Ocena metaloproteinaz w ostrej białaczce szpikowej"

Ostra białaczka szpikowa (OBSz) należy do najczęstszych nowotworów hematologicznych w populacji osób dorosłych i charakteryzuje się klonalnym rozrostem hematopoetycznych komórek macierzystych w szpiku kostnym. Klinicznie OBSz objawia się najczęściej hyperleukocytozą i objawami niewydolności szpiku w zakresie prawidłowych linii krwiotwórczych. Etiopatogeneza OBSz nie została wyjaśniona, jednak u części pacjentów stwierdza się narażenie na karcynogeny chemiczne w przeszłości, a u większości chorych występują powtarzalne zaburzenia cytogenetyczne i molekularne, które są również podstawą współczesnych klasyfikacji tej białaczki. Rokowanie w OBSz jest zróżnicowane, przy czym u istotnego odsetka młodszych chorych możliwe jest całkowite wyleczenie za pomocą intensywnej chemioterapii z ewentualną konsolidacją za pomocą allogenicznego przeszczepienia krwiotwórczych komórek macierzystych. Natomiast u pacjentów w wieku starszym, którzy nie kwalifikują się do tak intensywnego leczenia, długoletnie przeżycia są rzadkie.

Metaloproteinazy stanowią grupę podobnych strukturalnie enzymów, należącą do rodziny proteaz, które charakteryzują się zdolnością do degradacji różnych składowych macierzy zewnątrzkomórkowej. Metaloproteinazy odgrywają istotną rolę w wielu procesach

fizjologicznych, obejmujących m.in. organogenezę, angiogenezę czy regulację apoptozy. Wykazano również ich udział w onkogenezie, szczególnie w zakresie mechanizmów proliferacji i przerzutowania guzów litych. Znaczenie metaloproteinaz w odniesieniu do nowotworów hematologicznych jest stosunkowo mało poznane.

Celem rozprawy doktorskiej mgr Jacka Pietrzaka było określenie roli wybranych metaloproteinaz - MMP1, MMP2, MMP9 oraz MMP16 w przebiegu OBSz. Należy podkreślić, że wybrany przez Doktoranta i Promotora doktoratu problem naukowy ma istotne znaczenie poznawcze i potencjalnie kliniczne.

Przedstawiona do oceny praca ma układ typowy dla rozpraw doktorskich. Liczy ogółem 124 stron i zawiera 130 pozycji piśmiennictwa, z których większość pochodzi z renomowanych czasopism zagranicznych i była opublikowana w ostatnich 10 latach. Praca napisana jest poprawnym stylistycznie językiem, a także bardzo dobrze przygotowana pod względem edytorskim. Tekst uzupełniony jest 8 odpowiednio zaprojektowanymi tabelami oraz 38 dopracowanymi graficznie rycinami. Zamieszczony w pracy wykaz skrótów ułatwia zrozumienie tekstu.

W pierwszej części liczącego 36 strony „Wstępu” Doktorant szczegółowo i w oparciu o najnowsze piśmiennictwo omawia epidemiologię, etiopatogenezę, obowiązujące klasyfikacje, czynniki rokownicze oraz postępowanie terapeutyczne w OBSz. Druga część „Wstępu” poświęcona jest charakterystyce metaloproteinaz, przy czym dokładnie opisana jest ich budowa i funkcje, a także potencjalny udział w onkogenezie. Doktorant koncentruje się przede wszystkim na roli wyselekcjonowanych do badań białek, tj. MMP1, MMP2, MMP9 oraz MMP16.

„Wstęp” jest klarownym i logicznym wprowadzeniem do przedstawienia założeń i głównego celu pracy, który stanowiło określenie roli MMP1, MMP2, MMP9 oraz MMP16 w przebiegu OBSz w oparciu o:

- Ocenę obecności i poziomów ekspresji genów *MMP1*, *MMP2*, *MMP9* i *MMP16* u pacjentów z ostrą białaczką szpikową, oraz w grupie kontrolnej.
- Ocenę obecności i różnic w stężeniu MMP1 w surowicy pacjentów z ostrą białaczką szpikową i w surowicy osób z grupy kontrolnej.
- Porównanie aktywności żelatynolitycznej surowic pacjentów z ostrą białaczką i grupą kontrolną za pomocą techniki zymograficznej.

Do osiągnięcia założonego celu pracy mgr Jacek Pietrzak zastosował właściwe metody badawcze. Zostały one dokładnie opisane w liczącym 20 stron rozdziale „Materiały i metody”. Doświadczenia przeprowadzono w grupie 56 chorych na OBSz oraz w grupie kontrolnej 60 osób, u których nie stwierdzono nowotworu. Opisane precyzyjnie metody badań obejmują ocenę ekspresji genów *MMP1*, *MMP2*, *MMP9* i *MMP16* w leukocytach krwi obwodowej za pomocą ilościowej reakcji odwrotnej transkrypcji-łańcuchowej reakcji polimerazy (qRT-PCR), test ELISA do analizy stężenia białka MMP1 w surowicy oraz zymografię z żelatyną do oceny aktywności proteolitycznej MMP2 i MMP9 w surowicy.

W liczącym 19 stron rozdziale „Wyniki” Doktorant szczegółowo omawia rezultaty przeprowadzonych eksperymentów ilustrując je czytelnymi wykresami i tabelami. Do najważniejszych wyników należy zaliczyć wykazanie, że ekspresja wszystkich badanych genów metaloproteinaz z wyjątkiem *MMP9*, czyli genów *MMP1*, *MMP2* i *MMP16* jest niższa w leukocytach krwi obwodowej chorych na OBSz w porównaniu z osobami zdrowymi. Co interesujące, nie wykazano różnic w stężeniach białka MMP1 w surowicy i aktywności proteolitycznej MMP2 i MMP9 pomiędzy grupą kontrolną a pacjentami z OBSz. Ponadto, nie zaobserwowano istotnego związku pomiędzy odpowiedzią na terapię indukującą remisję a poziomem ekspresji *MMP1*, *MMP2*, *MMP9* i *MMP16* przed rozpoczęciem leczenia.

W interesującej „Dyskusji” Doktorant szczegółowo omawia wyniki przeprowadzonych badań w kontekście ich potencjalnego znaczenia dla wyjaśnienia roli badanych metaloproteinaz w OBSz. Dyskusję rozpoczyna obszernie omówienie opublikowanych przez innych autorów danych na temat roli metaloproteinaz w kontekście prawidłowej hematopoezy oraz w patogenezie nowotworów hematologicznych, szczególnie OBSz. Następnie dyskutowane są rezultaty badań własnych Doktoranta. Co istotne, Doktorant analizuje również potencjalne trudności związane z interpretacją uzyskanych wyników, szczególnie analizy zymograficznej.

Na zakończenie Doktorant przedstawił wniosek końcowy, który odpowiada zasadniczemu celowi pracy, jakim było określenie roli wybranych metaloproteinaz w OBSz:

- *MMP1*, *MMP2* oraz *MMP16* mogą pełnić rolę hamującą w rozwoju ostrej białaczki szpikowej. Rozbieżności w wynikach pomiędzy poziomem ekspresji wymienionych genów metaloproteinaz a obecnością ich produktów w surowicy, wskazywać może na znaczącą syntezę metaloproteinaz przez komórki, które nie są leukocytami.

W mojej opinii najważniejszym osiągnięciem pracy mgr Jacka Pietrzaka jest wykazanie przez Doktoranta obniżonej ekspresji genów badanych metaloproteinaz (MMP1, MMP2 oraz MMP16) w OBSz, która jednak nie przekłada się na różnice stężeń kodowanych przez te geny białek. Jest to wynik ważny naukowo, podkreśla heterogenność patogenezy różnych typów nowotworów i może być punktem wyjścia dla dalszych interesujących i potencjalnie istotnych klinicznie badań. Oprócz interesujących wyników pracy, należy również podkreślić dobry warsztat naukowy Doktoranta.

Po wnikliwej analizie rozprawy doktorskiej mgr Jacka Pietrzaka mam kilka uwag, które powinny być uwzględnione przed publikacją uzyskanych wyników:

1. Pewne zastrzeżenia budzi wnioskowanie na podstawie stosunkowo małych podgrup pacjentów. Grupa badana chorych na OBSz liczy 56 osoby, co wydaje się zupełnie wystarczające do porównania z podobnie liczną grupą kontrolną (n=60), co było głównym celem doktoratu. Natomiast analizy w poszczególnych podgrupach, dotyczące np. różnic pomiędzy podtypami OBSz lub odpowiedzi na terapię indukującą mogą wiązać się z ryzykiem wyników fałszywie ujemnych, ze względu na małą liczbę chorych. Przykładowo jeden z wstępnych wniosków dotyczy między innymi grupy z podtypem M3, w której znajduje się tylko 1 pacjent (Tabela 5). Częściowo wynika to z brakujących danych np. o podtypie OBSz (26 chorych) lub rodzaju odpowiedzi na leczenie (20 chorych), które być może mogą zostać uzupełnione, co poprawiłoby jakość wyników. Należy jednak podkreślić, że ta uwaga nie dotyczy podstawowych celów pracy, czyli porównania OBSz i populacji osób bez nowotworu.
2. W odniesieniu do charakterystyki grupy badanej w Tabeli 5, brakuje informacji o wieku pacjentów, który jest bardzo ważnym czynnikiem w odniesieniu do biologii i rokowania w OBSz. Parametr ten powinien również zostać przeanalizowany pod kątem różnic w ekspresji genów i białek badanych metaloproteinaz.
3. W odniesieniu do obserwowanej rozbieżności pomiędzy ekspresją genów metaloproteinaz w komórkach krwi obwodowej, a stężeniem białek w surowicy,

oprócz postulowanej możliwości produkcji przez inne komórki, przedyskutowana powinna być szerzej możliwość regulacji potranskrypcyjnej. Ponadto, warto zastanowić się nad wtórnym wpływem klonu nowotworowego na zdrowe leukocyty, ponieważ w przypadku OBSz tylko część komórek krwi obwodowej stanowią komórki białaczkowe. Tutaj przydatna byłaby również informacja o ewentualnej zależności pomiędzy odsetkiem komórek nowotworowych (mieloblastów) we krwi obwodowej u poszczególnych pacjentów a ekspresją i stężeniem badanych metaloproteinaz.

4. Praca jest bardzo dobrze przygotowana pod względem edytorskim. Jediną rzeczą do poprawy w tym zakresie jest niepotrzebne okresowe używanie przez Doktoranta pełnej nazwy po wprowadzeniu dla niej skrótu (np. naprzemienne stosowanie terminu „ostra białaczka szpikowa” i AML).

Powyższe uwagi nie mają wpływu na moją wysoką ocenę rozprawy doktorskiej mgr Jacka Pietrzaka. Jest ona napisana bardzo poprawnie pod względem językowym i dopracowana edycyjnie, a uzyskane wyniki i sformułowane wnioski zostały bardzo dobrze udokumentowane. Doktorant zrealizował założony cel pracy w oparciu o rozległy warsztat naukowy, wykorzystując kilka niezależnych metod badawczych. Jestem przekonany, że praca doktorska mgr Jacka Pietrzaka stanowi samodzielne rozwiązanie przez Niego ważnego problemu naukowego. Praca ma szereg aspektów poznawczych i stanowi podstawę do dalszych badań.

Podsumowując uważam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 13 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. nr 65 poz. 5 z późn. zm.). Mam zaszczyt przedstawić Radzie Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi recenzję pracy i prosić Wysoką Radę o dopuszczenie mgr Jacka Pietrzaka do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

