



# UNIwersytet Medyczny IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH WE WROCLAWIU

Katedra i Zakład Toksykologii  
Kierownik prof. dr hab. Agnieszka Piwowar

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Jacka Pietrzaka**

**pt. „Ocena metaloproteinaz w ostrej białaczce szpikowej”**

wykonanej w Zakładzie Biochemii Farmaceutycznej i Diagnostyki Molekularnej

Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

**promotor: prof. dr hab. Marek Mirowski**

Ostra białaczka szpikowa (AML) jest chorobą nowotworową układu krwiotwórczego, która w przeważającej większości dotyczy osób dorosłych, stanowiąc w tej grupie pacjentów około 80% ostrych białaczek. Ryzyko rozwoju AML zwiększa się wraz z wiekiem, a szczególnie zagrożone są osoby po 65. roku życia, ponadto częstość występowania jest większa u mężczyzn niż u kobiet. Mimo, iż dane z piśmiennictwa wskazują na udział różnych czynników zwiększających ryzyko rozwoju AML, takich jak wrodzone choroby genetyczne, promieniowanie jonizujące, ekspozycja na środki chemiczne, palenie papierosów czy stosowanie niektórych leków, to dokładne przyczyny rozwoju tej choroby nie są w pełni zidentyfikowane. Dane kliniczne wskazują, iż nieleczona ostra białaczka szpikowa rozwija się szybko i powoduje zgon chorego w ciągu 2-3 miesięcy od rozpoznania. Badanie mechanizmów lub czynników uczestniczących w zwiększonej zapadalności na AML, czy też wpływających na bardziej złożony przebieg choroby lub gorsze rokowanie, jest wciąż aktualnym problemem klinicznym. Stwarza to szeroki obszar do działań naukowych, w co bardzo dobrze wpisują się badania podjęte przez Pana mgr Jacka Pietrzaka, dotyczące oceny zmian ekspresji, aktywności, czy stężenia wybranych metaloproteinaz w ostrej białaczce szpikowej.

Metaloproteinazy macierzy pozakomórkowej (MMP) są dużą rodziną białek o aktywności proteolitycznej. Odgrywają one bardzo istotną rolę w licznych procesach fizjologicznych (jak np. organogeneza czy gojenie się ran). Dobrze udokumentowany jest także ich udział w patomechanizmie wielu innych chorób, również nowotworowych. Wskazywany jest istotny związek MMP z zaawansowaniem czy złośliwością nowotworu, co dotyczy zwłaszcza nowotworów litych, natomiast

stosunkowo niewiele danych odnosi się do roli metaloproteinaz w nowotworach hematologicznych, co stało się przesłanką do podjęcia badań przez Pana mgr Jacka Pietrzaka. W świetle powyższych informacji wybór tematu rozprawy doktorskiej jest więc trafny i zgodny z kierunkiem współczesnych badań biomedycznych oraz aktualnym stanem wiedzy, a problem badawczy podjęty przez Doktoranta jest ważny i interesujący.

Przedłożoną do oceny rozprawę doktorską stanowią 124 numerowane strony maszynopisu, w typowym dla dysertacji doktorskich o charakterze doświadczalnym układzie, z prawidłowo wyodrębnionymi najważniejszymi rozdziałami, takimi jak: *Wstęp, Cel pracy, Materiał i metody, Wyniki, Dyskusja, Wnioski i Piśmiennictwo*. Dysertacja zawiera również *Streszczenie* oraz słowa kluczowe w języku polskim i angielskim, a także *Wykaz skrótów, Spis tabel (w liczbie 8) oraz Spis rycin (aż 38)*, co znacząco pomaga w odbiorze tekstu pracy. Do dysertacji dołączone jest ponadto stosowne *Oświadczenie* Doktoranta, iż jest on wyłącznym twórcą przedłożonej do oceny rozprawy. Opracowanie zawiera również *Wykaz autorskich i współautorskich publikacji (7) oraz wystąpień konferencyjnych (7)* Doktoranta, o sumarycznej punktacji MNiSW **93** oraz współczynniku wpływu **13.132**, co wskazuje na duże zaangażowanie naukowe Pana magistra oraz umiejętności krytycznej analizy danych i syntetycznego ich przedstawienia, co również znalazło potwierdzenie w prawidłowo skonstruowanej dysertacji oraz bardzo dobrym przedyskutowaniu uzyskanych wyników w rozdziale *Dyskusja*, popartych prawidłowo sformułowanymi i logicznymi wnioskami zamykającymi dysertację. Z obowiązku Recenzenta muszę natomiast przypomnieć, iż rozwinięcie danego skrótu użytego w pracy należałoby podać bezpośrednio przy jego pierwszym pojawieniu się w tekście. Ponadto nie jest konieczne kilkukrotne rozwijanie skrótu nazwy kolejnych metaloproteinaz, które różnią się jedynie cyfrą opisującą dany enzym. Odpowiednio dobrane piśmiennictwo, liczące 130 pozycji literaturowych, jest właściwie wykorzystane i zacytowane w pracy. Sięga ono bieżącego roku i w prawie 30% pochodzi z ostatnich 5 lat, co wskazuje na aktualność podjętego tematu badawczego. W opinii Recenzenta wskazanym jest podanie daty dostępu do cytowanych pozycji piśmiennictwa pochodzących ze stron internetowych oraz ujednolicenie sposobu zapisu wszystkich podanych w tym rozdziale odnośników piśmiennictwa. Ponadto w niektórych przypadkach brak jest nazw czasopism czy adekwatnego skrótu, temu czy numeru stron, co należałoby uzupełnić przygotowując manuskrypt pracy do druku.

Treść poszczególnych rozdziałów odpowiada tematowi przedstawionemu w ich tytułach. Część teoretyczna dysertacji jest prawidłowo skonstruowana i stanowi dobre wprowadzenie i uzasadnienie podjętych badań. W tej części rozprawy Pan mgr Jacek Pietrzak, w oparciu o aktualne dane z piśmiennictwa, dobrze wprowadza w problem badawczy będący przedmiotem dysertacji, zwięźle przedstawiając zagadnienia związane z epidemiologią, etiopatogenezą, leczeniem i rokowaniem w przebiegu ostrej białaczki szpikowej. Jak podaje Autor, komórki nowotworowe w przebiegu białaczki charakteryzują się znaczną heterogennością cytogenetyczną, a ich identyfikacja nabrała szczególnego

znaczenia, zwłaszcza w ostatnich 15 latach. Obecnie uznany jest wpływ zmian genetycznych na przebieg tej jednostki chorobowej, co znalazło swoje bezpośrednie odzwierciedlenie w najnowszej klasyfikacji AML, która opiera się na wykryciu powtarzających się zmian cytogenetycznych występujących w komórkach białaczkowych. W tym aspekcie ocena obecności i poziomów ekspresji genów wybranych metaloproteinaz doskonale wpisuje się w te trendy badawcze. Znalazło to również swoje odzwierciedlenie w bardzo obszernie przedstawionym rozdziale dotyczącym tych enzymów, gdzie Doktorant początkowo przedstawia ogólną ich charakterystykę, klasyfikację, funkcje fizjologiczne i patologiczne oraz regulatory ich aktywności, a następnie bardziej szczegółowo charakteryzuje metaloproteinazy będące obiektem Jego badań, czyli MMP 1, 2, 9 oraz 16. Ta część dysertacji jest wzbogacona o przejrzyste schematy i tabele, które dobrze uzupełniają przedstawione treści.

Cel pracy został zwięźle przedstawiony w postaci jednego celu głównego, którym było określenie roli MMP1, MMP2, MMP9 oraz MMP16 w przebiegu ostrej białaczki szpikowej, oraz 3 celów częściowych, które po zapoznaniu się z treścią dysertacji, mogą z pełnym przekonaniem stwierdzić, iż zostały w pełni zrealizowane. Pan mgr Jacek Pietrzak badał obecność i ekspresję genów wybranych metaloproteinaz u pacjentów z ostrą białaczką szpikową, oraz w grupie kontrolnej; ocenił różnice w stężeniu MMP1 w surowicy pacjentów z AML i osób z grupy kontrolnej; a także dokonał porównania aktywności żelatynolitycznej surowic pochodzących od osób chorych oraz z grupy kontrolnej, a także dokonał analizy w odniesieniu do wieku, płci, typu cytogenetycznego czy stosowanego leczenia.

Kolejne części dysertacji, rozdziały *Materiał i metody oraz Wyniki*, stanowią obszerną jej część, co wskazuje na znaczący wkład pracy Doktoranta w przeprowadzenie badań, opracowanie i analizę wyników. Doktorant zastosował odpowiednie metody badawcze z adekwatnym opisem ich wykonania. Przedstawił metodę izolacji RNA z krwi badanych osób, podając również opis oceny i czystości wyizolowanego RNA. Przedstawił zastosowaną reakcję odwrotnej transkrypcji PCR ze szczegółowym opisem poszczególnych jej etapów oraz przykładowymi elektroforegramami, wykresami amplifikacji genów i krzywych topnienia dla poszczególnych genów. Rozdział ten został ponadto dobrze zobrazowany własnym schematem przebiegu testu ELISA dla pomiaru stężenia MMP1. Ponadto Autor zamieścił opis metody zymograficznej oceny aktywności żelatynolitycznej dla wybranych metaloproteinaz.

Materiał do badań, jak podaje Doktorant, „stanowiła krew pełna 56 pacjentów ze zdiagnozowaną ostrą białaczką szpikową oraz 60 osób, u których nie zaobserwowano obecności nowotworu”. Wydaje się, iż bardziej właściwym byłoby określenie - „u których nie zdiagnozowano ostrej białaczki szpikowej”. Należałoby również doprecyzować opis liczbowy przebadanych grup, gdyż nie do końca koresponduje on z danymi zawartymi w tabeli 5 i 6, dlatego też w opinii Recenzenta dobrym uzupełnieniem, porządkującym podane informacje, byłoby dodanie schematu przedstawiającego algorytm wykonywanych badań na poszczególnych etapach dla kolejnych grup

pacjentów. Ponadto wskazanym byłoby uzupełnienie tej części pracy o informacje dotyczące wieku badanych osób, gdyż dalsze analizy uzyskanych wyników dotyczą również tego parametru. Wydaje się także, iż tytuły tabel powinny być bardziej doprecyzowane. Wskazanym byłoby także podanie skąd pochodziły próby badane, gdyż sędzę, iż praca powstała we współpracy z jakąś jednostką kliniczną, oraz podanie numeru zgody właściwej komisji bioetycznej dla przeprowadzenia zaplanowanych badań.

Analiza uzyskanych wyników i zgromadzonych danych została dokonana zgodnie z zasadami przeprowadzania analizy statystycznej, w oparciu o adekwatne metody statystyczne. Rozdział *Wyniki* jest dobrze i obszernie opracowany, a wyniki właściwie przedstawione na licznych rycinach, co ułatwia czytającemu odbiór uzyskanych wyników i ich ocenę. W opinii Recenzenta wskazanym byłoby konsekwentne prezentowanie uzyskanych wyników na odpowiednich rycinach dla wszystkich przebadanych metaloproteinaz w odniesieniu do wieku i płci badanych osób. Dobrym uzupełnieniem byłoby także zobrazowanie wyników przedstawionych w rozdziale „Porównanie zależności pomiędzy względnym poziomem ekspresji genu MMP1 a cechami klinicznymi w grupie osób z ostrą białaczką szpikową (str. 76 i dalsze). Wskazanym byłoby również doprecyzowanie określenia „charakterystyka kliniczna pacjentów z ostrą białaczką szpikową” zamieszczonego w opisie Tabel 5 i 6, lub rozszerzenie informacji przedstawionych w tych tabelach.

W rozdziale *Dyskusja*, jak i w całej pracy, Pan magister Jacek Pietrzak właściwie dobrał i odpowiednio wykorzystał aktualne piśmiennictwo, bardzo dobrze odnosząc uzyskane wyniki własne do danych z piśmiennictwa światowego. Pozwoliło to Doktorantowi na właściwą analizę i interpretację uzyskanych wyników. Mimo, iż dane z piśmiennictwa pokazują związek metaloproteinaz z procesem nowotworzenia, to wyniki przeprowadzonych przez Doktoranta badań nie pokazały tak ścisłej zależności. Zachęcam Pana magistra do kontynuowania badań w tym kierunku i rozszerzenia ich zakresu, choćby o zbadanie stężenia inhibitorów tkankowych tych metaloproteinaz oraz ich ekspresji, co byłoby dobrym dopełnieniem prowadzonych badań. Również interesującym byłoby uzupełnienie przeprowadzonych badań o pomiar stężenia pozostałych analizowanych w pracy metaloproteinaz u chorych z ALM, a nie tylko przedstawionej w pracy MMP1, co należałoby uzasadnić w pracy, choćby w rozdziale *Dyskusja*. Z uwagi na aktualność i ważność podjętego przez Pana magistra tematu badawczego, jego kontynuacja byłaby nie tylko interesująca w aspekcie naukowym, ale również cenna ze względów klinicznych. Na uznanie zasługuje dobrze przemyślana strategia zaplanowania i przeprowadzenia badań oraz adekwatnie zastosowane metody badawcze.

Część teoretyczną dysertacji zamykają rozdziały *Wnioski oraz Streszczenie*, które dobrze reasumują obserwacje poczynione w oparciu o przeprowadzone badania. Oryginalnym osiągnięciem Doktoranta jest wykazanie, iż u chorych z ostrą białaczką szpikową spośród przebadanych metaloproteinaz, poziom ekspresji genów dla większości z nich (MMP1, MMP2 i MMP16) jest niższy w odniesieniu do grupy kontrolnej, choć bez cech istotności statystycznej. Co interesujące poziomy

ekspresji wszystkich badanych genów nie były zależne ani od płci czy wieku badanych osób, ani też nie różniły się u chorych z różną obecnością zmian cytogenetycznych w komórkach nowotworowych. Interesującą obserwacją jest stwierdzenie, iż poziom ekspresji MMP1, MMP2, MMP9 oraz MMP16 przed rozpoczęciem leczenia nie wpływał na wynik terapii pierwszym cyklem indukcyjnym. Z kolei ocena stężenia MMP1 u chorych z AML pokazała, iż u pacjentów o podtypie morfologicznym M2 ostrej białaczki szpikowej, stężenie tej metaloproteiny jest istotnie wyższe w stosunku do pozostałych chorych i osób z grupy kontrolnej. Ponadto analiza zymograficzna wybranych metaloprotein nie ujawniła różnic w występowaniu różnych form MMP2 i MMP9 między pacjentami z AML a grupą kontrolną. Jak konkluduje Autor, uzyskane wyniki wskazują, iż rola metaloprotein w ostrej białaczce szpikowej może być odmienna niż w przypadku nowotworów litych. Metaloproteiny mogą odgrywać istotną rolę w procesie prawidłowej hematopoezy, a ich upośledzona synteza może być wynikiem nieprawidłowego różnicowania się hematopoetycznej komórki pnia. W tym aspekcie uzyskane przez Pana magistra wyniki są ważne i obiecujące.

Z obowiązku Recenzenta, muszę jedynie zwrócić uwagę na pewne pojawiające się w niniejszej pracy sformułowania, które wymagają doprecyzowania. Przykładowo na str. 26 pojawia się określenie - „stan sprawności” – należałoby doprecyzować o jaki stan sprawności chodzi; na str. 27 - „uzyskanie dodatkowych profitów” – należałoby doprecyzować i przeredagować to stwierdzenie; str. 28 - „bieżące wysiłki” – należałoby doprecyzować to określenie; str. 40 - „usuwanie pozostałości po procesie gojenia” – również stwierdzenie to wymaga przeredagowania; str. 67 - podany jest czas inkubacji próbek, natomiast brak jest informacji o temperaturze; str. 96 – określenie „manipulować komórkami zrębu” również wymagałoby przeredagowania. Doprecyzowania wymagają opisy rycin 34 – 37, co poprawiłoby odbiór przedstawionych na nich wyników. Wskazaniem byłoby również zamieszczanie opisów pod rycinami. Zauważono również pojedyncze błędy literowe. Powyższe uwagi nie wpływają na wysoką ocenę merytoryczną przedłożonej do recenzji rozprawy.

Podsumowując, podjęty problem badawczy przedłożonej do recenzji dysertacji jest aktualny i ważny, a Pan mgr Jacek Pietrzak w pełni zrealizował założony cel pracy. Wyrazem naukowej wartości oraz oryginalności i nowatorskiego charakteru przeprowadzonych badań, jest brak danych w piśmiennictwie naukowym w takim aspekcie. Przedstawiona do oceny dysertacja bardzo dobrze wpisuje się więc w światowe trendy badań nad patogenezą, progresją, skutecznością terapii, czy prognozowaniem przeżycia osób z chorobami nowotworowymi krwi. Stanowi ona oryginalny i znaczący wkład do współczesnej wiedzy na temat polimorfizmów genetycznych jako czynników determinujących uszkodzenia DNA w ostrej białaczce szpikowej. Uzyskane wyniki stanowią przesłankę do ich wykorzystania jako parametrów przydatnych w diagnostyce i monitorowaniu omawianej jednostki chorobowej. Kontynuacja tych badań w systemie *follow up* byłaby cennym uzupełnieniem i

rozwinięciem podjętego wątku badawczego, z uwagi na obiecujące uzyskane wyniki własne, do czego zachęcam Pana magistra.

Wniosek końcowy: przedstawiona do recenzji rozprawa opatrzona tytułem „Ocena metaloproteinaz w ostrej białaczce szpikowej” jest oryginalnym dorobkiem badawczym Pana mgr Jacka Pietrzaka i spełnia wszystkie wymogi stawiane rozprawom doktorskim 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 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 Jacka Pietrzaka do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

22.10.2019r., Wrocław

Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu  
KATEDRA i ZAKŁAD TOKSYKOLOGII

kierownik

prof. dr hab. Agnieszka Piwowar