

Dr hab. n. med. Sebastian Grosicki  
Zakład Profilaktyki Chorób Nowotworowych  
Wydział Zdrowia Publicznego w Bytomiu  
Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

### Recenzja

rozprawy doktorskiej na stopień naukowy doktora nauk medycznych  
mgr inż. Katarzyny Elżbiety Gębury pt. "Znaczenie ekspresji i polimorfizmu genu  
kodującego receptor dla czynnika stymulującego wzrost kolonii granulocytów  
(CSF3R) w przeszczepieniu komórek mobilizowanych ze szpiku do krwi  
obwodowej"

wykonanej w Laboratorium Immunogenetyki Klinicznej i Farmakogenetyki Instytutu  
Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN im. L. Hirszfelda we Wrocławiu.  
Promotorem rozprawy doktorskiej jest Pani prof. dr hab. n. biol. Katarzyna Bogunia-Kubik.  
Promotorem pomocniczym rozprawy doktorskiej jest Pani dr hab. n. med. Aleksandra Butrym.

Podstawę formalną wykonania recenzji stanowi pismo Dyrektora Instytutu Immunologii i  
Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu RN-  
27/2018 z dnia 19 kwietnia 2018 roku.

Pozyskanie wystarczającej liczby macierzystych komórek hematopoetycznych (HSC) od  
zdrowego dawcy do przeszczepu alogeneicznego, czy chorego do przeszczepu autologicznego  
(autoHSCT) jest z całą pewnością kluczowym etapem każdego przeszczepienia. Jako źródło  
tych komórek obecnie najczęściej wykorzystuje się krew obwodową, skąd pobiera się je po  
wcześniejszym zmobilizowaniu ze szpiku kostnego przy użyciu tzw. leczenia mobilizującego,  
którego podstawowym elementem jest granulocytowy czynnik wzrostowy (G-CSF) często  
łączony z chemioterapią przy kolekcjonowaniu HSC od chorych do autotransplantacji. Niestety  
nie zawsze, zwłaszcza przy pozyskiwaniu HSC z krwi obwodowej, mobilizacja, a następnie ich  
kolekcjonowanie jest skuteczne. Często przyczyną nieskuteczności poboru komórek do  
autoprzyszczepienia jest intensywne poprzedzające postępowanie przeciwnowotworowe  
obejmujące mielotoksyczne chemioterapeutyki oraz radioterapię. Są jednak przypadki, gdzie  
nie udaje się zmobilizować, a następnie skolekcjonować wystarczającej dla przeprowadzenia  
transplantacji liczby HSC, w których nie rozumiemy tego przyczyny, a co wiąże się z ciągle nie  
do końca znanymi mechanizmami regulującymi te procesy. Tymi właśnie kluczowymi  
zagadnieniami dla zrozumienia mechanizmów kierujących mobilizacją i możliwościami  
pozyskiwania HSC od dawcy zajęła się doktorantka.

Jako model swoich badań wybrała ona chorych na szpiczaka plazmocytozy (MM),  
chłoniaki niezłaznicze (NHL), chłoniaka Hodgkina (HL) oraz ostrą białaczkę szpikową (AML),  
czyli tych u których w procesie leczenia jako konsolidację wykorzystuje się przeszczepienie  
autologicznych macierzystych komórek krwiotwórczych z krwi obwodowej.

Warte podkreślenia jest, że praca została zrealizowana w ramach grantu PRELUDIUM  
Narodowego Centrum Nauki.

Doktorantka zestawiała na początku rozprawy 4 publikacje, które dotyczą tematyki rozprawy doktorskiej. Dwie z nich zostały opublikowane w roku 2012, a dalsze dwie oczekują na publikację. W trzech z nich doktorantka jest pierwszym autorem. Poza tym tematyka związana z rozprawą doktorską była przedmiotem 5 doniesień konferencyjnych w latach 2016-2017 ogłoszonych na konferencjach polskich i zagranicznych.

Powyższy dorobek jak również wstęp, w którym doktorantka porusza się swobodnie w tematyce związanej z przeszczepianiem HSC w sensie technicznym, ale również w obrębie wskazań do różnych rodzajów transplantacji HSC wskazuje na jej szerokie kompetencje w zakresie transplantologii szpiku. Dobrze, że wskazuje ona na dorobek polskich hematologów na tle naukowców na świecie, którzy położyli podwaliny pod budowę sieci ośrodków przeszczepiania szpiku w Polsce udostępniając tę metodę leczenia chorym. Najpewniej jednak z powodu tego, że doktorantka nie jest lekarzem nie ustrzegła się w tej części od drobnych błędów. G-CSF jest aplikowany najczęściej podskórnie, a nie dożylnie, zwłaszcza podawany zdrowym dawcom, gdzie materiał pobiera się do przeszczepienia alogenicznego. Podawanie dożylnie, jak pisze doktorantka, wiązać by się musiało z wielogodzinną infuzją na pompie strzykawkowej i związaną z tym znacznie większą uciążliwością dla dawcy. Ta droga wykorzystywana jest w sytuacjach wyjątkowych, jeżeli mamy do czynienia z małopłytkowością, która przy podaniu podskórnym stwarzałaby ryzyko powstawania krwiaków i związanych z nimi powikłań. Doktorantka podaje również błędnie, że chory po przeszczepieniu może opuścić oddział szpitalny po regeneracji limfocytów i trombocytów. Oczywiście, że regeneracja limfocytów jest bardzo ważna dla ustabilizowania mechanizmów odpornościowych, ale dla możliwości wypisu z zamkniętego oddziału ważniejsza znacznie jest regeneracja granulocytów, co jest monitorowane i często wspomagane stosowaniem G-CSF. W sposób bardzo rzeczowy opisuje doktorantka mechanizmy mobilizacji HSC ze szpiku kostnego. Zwraca również uwagę na znaczenie G-CSF dla tych procesów podkreślając, że ekspresja tego białka zlokalizowana jest nie tylko w szpiku kostnym, ale również w endometrium, nadnerczach, wyrostku robaczkowym, płucach i przetyku i wielu innych narządach. Tutaj wkraść się drobny potoczyzm w określeniu „woreczek żółciowy”. Oczywiście powinno być pęcherzyk żółciowy.

Dalej w sposób bardzo przejrzysty doktorantka omawia temat receptora dla G-CSF. Omawia jego budowę, gen kodujący to białko oraz całą kaskadę zdarzeń, które dotyczą wiązania do niego G-CSF. Zwraca uwagę na szlaki przekazywania sygnału JAK/STAT oraz rolę białek SOCS.

Po tym ciekawym wprowadzeniu pojawia się cel pracy, którym jest zbadania związku zmienności polimorficznej genu CSF3R, ekspresji wybranych genów (G-CSF, jego receptora CSF3R, czynników transkrypcyjnych STAT1, -3, -5 i supresora przekazywania sygnału SOCS3) na poziomie mRNA oraz ekspresji CSF3R na neutrofilach i monocytach z efektywnością mobilizacji i tempem odnowy hematopoezy pacjentów poddanych autoHSCT.

Materiałem do badań było 105 próbek pozyskanych od chorych poddawanych autoHSCT w Klinice Hematologii, Nowotworów Krwi i Transplantacji Szpiku UM we Wrocławiu. Przeszczepienia te odbyły się w okresie 2012-2017. Grupę kontrolną stanowiło łącznie 279 zdrowych osób, honorowych dawców krwi RCKiK we Wrocławiu. Krew od pacjentów pobierana była przed podaniem G-CSF, a następnie po 5 dniach od rozpoczęcia leczenia mobilizującego. Krew od zdrowych osób pobierano jednorazowo. Badanie przeprowadzono w oparciu o zgodę Komisji Bioetycznej UM we Wrocławiu. W dalszej części doktorantka bardzo szczegółowo podaje warsztat dotyczący badania polimorfizmu genu CSF3R obejmujący odczynniki, przyrządy i aparaturę laboratoryjną. Omówiono kryteria wyboru polimorfizmów do badań. Bardzo szczegółowo doktorantka opisuje kolejne kroki diagnostyki laboratoryjnej

jak izolacja DNA, badanie polimorfizmu rs3917024 genu CSF3R z wykorzystaniem techniki PCR-RFLP opisując tą technikę bardzo szczegółowo. Następnie omawia badanie polimorfizmów rs3918001, rs3918020, rs3919021 oraz rs146617729 genu CSF3R z wykorzystaniem komercyjnie dostępnych zestawów starterów i sond LightSNiP. W dalszej części rozprawy opisano sekwencjonowanie fragmentu obejmującego rejon polimorfizmu rs3918021 genu CSF3R. Opis tej części rozprawy był bardzo szczegółowy. Przedstawiono go jednak w sposób przejrzysty ilustrując oryginalnymi rycinami.

W dalszej części doktorantka skupiła się na opisie warsztatu wykorzystanego dla zbadania ekspresji genów szlaku G-CSF na poziomie mRNA. Również tutaj szczegółowo zapoznaje z zestawem wykorzystywanych odczynników, sekwencji starterów wykorzystywanych podczas reakcji ilościowego PCR w czasie rzeczywistym, a następnie wykorzystywanego oprzyrządowania. Omawia proces izolacji RNA omawiając kolejne jej etapy. Następnie skupia się na odwrotnej transkrypcji by w końcu w sposób bardzo obrazowy omówić ilościowy PCR dla analizy ekspresji genów G-CSF, CSF3R, STAT1, STAT3, SATT5A, SATT5B i SOCS3 na poziomie mRNA.

W dalszej części rozprawy doktorskiej opisano analizę ekspresji białka CSF3R na powierzchni neutrofilów i monocytów. Również tutaj doktorantka podaje szczegółowo zestaw użytych odczynników i sprzętu. W dalszej części bardzo wyczerpująco omówiła metodykę wykorzystującą cytometrię przepływową. Tą część również bogato ilustrowała rycinami, co w znacznym stopniu ułatwia lekturę dotyczącą tych trudnych zagadnień laboratoryjnych.

W podrozdziale dotyczącym stosowanych analiz statystycznych podała informacje porządkujące kierunki analiz.

W dalszej części dysertacji opisano wyniki. Nie znaleziono różnic między liczbą koniecznych leukafarez dla uzyskania wystarczającej liczby HSC do transplantacji w zależności od diagnozy chorego. Nie znaleziono również związku z wydajnością pierwszej leukafarezy a diagnozą chorego. Doktorantka zwraca jednak uwagę na statystycznie większą liczbę komórek CD34+ pozyskanych od chorych na MM i NHL niż z HL. Wyniki dotyczące szybkości regeneracji po autoHSCT wydają się być dość przypadkowe i wynikające z małych grup chorych z niektórymi nowotworami.

W dalszej części doktorantka omawia wyniki analizy polimorfizmów genów. Opisuje dystrybucję genotypów i alleli u pacjentów i osób zdrowych podkreślając, że nie różniły się one znacząco od znanych danych dotyczących populacji europejskiej. Nie różniły się one między osobami zdrowymi i chorymi, jak również między chorymi z różnymi diagnozami.

Nie stwierdzono również związku żadnego z polimorfizmów genu CSF3R z wydajnością mobilizacji u przebadanych chorych, jak również nie znaleziono korelacji z tempem regeneracji hematopoezy po autoHSCT.

Obserwowano zmiany w ekspresji genów szlaku G-CSF w odpowiedzi na podanie G-CSF. U jednych chorych one wzrastały, a u innych malały, ale co istotne ekspresje te nie zmieniały się istotnie po podaniu G-CSF. Nie odróżniały one również chorych, którzy nie byli podatni na mobilizację komórek CD34+ od pozostałych chorych. Odnotowano ciekawe zależności między ekspresją genów CSF3R, STAT1, -3, -5A, -5B oraz SOCS3. Okazało się, że przed podaniem G-CSF poziomy prawie wszystkich badanych genów były ze sobą skorelowane.

Jedynie poziom mRNA STAT1 był negatywnie skorelowany z efektywnością mobilizacji. Doktorantka zwraca uwagę na negatywną korelację między ekspresją genu STAT3 a efektywnością mobilizacji. Zaobserwowano także, że odnowa hematologiczna po autoHSCT była szybsza u osób, u których w następstwie podania G-CSF notowano spadek poziomu mRNA genów CSF3R.

Analizując ekspresję CSF3R na neutrofilach i monocytach odnotowano, że liczba obu tych populacji leukocytów wzrasta znamienne po podaniu G-CSF, ale ich liczba nie korelowała z sukcesem mobilizacji. Zaobserwowano, że odsetek neutrofilów i monocytów u chorych przed mobilizacją w porównaniu ze zdrowymi osobami był istotnie wyższy. Co ciekawe ekspresja CSF3R na neutrofilach i monocytach w 5 dniu podawania G-CSF istotnie się zmniejszyła. Zaobserwowano negatywną korelację pomiędzy ekspresją CSF3R na neutrofilach chorego, a skutecznością mobilizacji, czego nie udało się wykazać w stosunku do monocytów.

Dyskusja została podzielona na podrozdziały. W pierwszym doktorantka odnosi się do kwestii czynników wpływających na wydajność mobilizacji. Prawidłowo analizuje i wskazuje na wiodącą rolę wcześniejszej terapii przeciwnowotworowej jako czynnika mogącego negatywnie korelować z pozyskiwaniem materiału do autoHSCT. Odnosząc się do chorych na szpiczaka plazmocytozy jako standardowe zestawy chemioterapii indukującej wymienia CDT i VAD, które nie są już współcześnie standardem, a które z uwagi na ograniczoną skuteczność zostały współcześnie wyparte przez zestawy polichemioterapii oparte na bortezomibie. W odniesieniu do leczenia NHL również umieszczony tutaj wywód dotyczący leczenia tych chorych nie jest zgodny z obowiązującym standardem, którym jest immunochemioterapia z wykorzystaniem rytuksymabu, bez którego trudno sobie dziś wyobrazić postępowanie terapeutyczne w chłoniakach B-komórkowych. W tych fragmentach dysertacji zabrakło mi również odniesień do piśmiennictwa.

W drugiej części dyskutowane są polimorfizmy genu CSFR3. Doktorantka zwraca słusznie uwagę na fakt, że badania nad ich znaczeniem są unikatowe, ale niestety wnioskowanie na temat ich znaczenia, z uwagi na ich rzadkość populacyjną wymagałyby przebadania dużo większej liczby osób, a uzyskane dotąd dane własne i innych autorów raczej przeczą ich znaczeniu dla wydajności mobilizacji komórek, mimo tego, że powinny potencjalnie modulować ekspresję i aktywność receptora dla G-CSF.

W kolejnej części dyskusji znajdujemy rozważania nad znaczeniem ekspresji genów szlaku G-CSF na poziomie mRNA. Doktoranta w sposób bardzo ciekawy odnosi się do znaczenia mRNA STAT1, STAT3 i STAT5A, STAT5B i SOCS dla przekazywania sygnałów po podaniu G-CSF. Zwraca uwagę na potencjalne znaczenia STAT3, STAT5A, STAT5B i SOCS3 dla mobilizacji komórek, natomiast STAT5A dla odnowy hematologicznej po autoHSCT.

W ostatniej części dyskusji doktorantka odnosi się do części pracy, w której badała ekspresję CSF3R na neutrofilach i monocytach. Zwraca uwagę, że liczba tych pierwszych we krwi osób poddanych mobilizacji nie koreluje z jej sukcesem, a ekspresja na nich CSF3R koreluje w sposób negatywny. Monocyty w sposób bardzo ciekawy reagują na podanie G-CSF, ale w badaniu nie udało się wykazać charakteru ich aktywności, ani korelacji ich liczby z efektywnością mobilizacji komórek.

Rozprawa doktorska zakończona jest podsumowaniem i wnioskami, które w sposób bardzo syntetyczny podsumowują najważniejsze wyniki przedstawionych badań. Wnioski w sposób prawidłowy odpowiadają na założone cele pracy.

Dla porządku muszę podać, że przedstawiona mi do recenzji dysertacja doktorska zawiera 105 stron wydruku komputerowego. Ma układ typowy, na który składają się strona tytułowa, spis treści, wykaz użytych skrótów, wykaz 15 tabel, wykaz 40 ilustracji, streszczenia w języku polskim i angielskim, wstęp, cel pracy, materiały i metody, wyniki, dyskusja, podsumowanie, wnioski i bibliografia obejmująca 109 pozycji aktualnego, prawidłowo dobrane i ułożonego alfabetycznie piśmiennictwa oraz 6 źródeł internetowych.

Podsumowując chciałbym stwierdzić, że z dużą przyjemnością i zainteresowaniem zapoznałem się z wynikami badań doktorantki, a następnie przygotowałem tę recenzję.

Postawiła ona sobie bardzo ambitne i rozległe cele badawcze, które wymagały od niej perfekcyjnego wykorzystania warsztatu laboratoryjnego, ale również zaangażowania mnóstwa czasu i energii w przeprowadzenie wszystkich żmudnych procedur. Badania mają charakter nowatorski, a temat jakim są zagadnienia związane z pozyskiwaniem HSC do przeszczepień wydaje mi się kluczowy dla jeszcze powszechniejszego wykorzystanie technik transplantacji szpiku dla leczenia chorych na nowotwory hematologiczne.

Badania, które doprowadziły do powstania tej rozprawy, były zaplanowane w sposób bardzo przemyślany i dojrzały, co wskazuje na duże doświadczenie doktorantki nabyte pod opieką naukową promotora Pani prof. dr hab. Katarzyny Bogunia-Kubik. Muszę tutaj podkreślić również wartość praktyczną podjętej tematyki badań, a pasja jaką wyczuwa się czytając dysertację doktorską powoduje, że jestem przekonany o braku potrzeby zachęcania doktorantki do stawiania sobie i rozwiązywania kolejnych celów badawczych. Pod względem edytorskim rozprawa została przygotowana bardzo starannie i nie doszukałem się w niej istotnych błędów.

Należy zaznaczyć, że zawarte w tej recenzji uwagi nie umniejszają jakości pracy i stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji dysertacja doktorska spełnia wymogi stawiane rozprawom na stopień doktora zgodnie z Ustawą z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Z 2003 r., Nr 65, poz. 595 z późniejszymi zmianami wprowadzonymi przez Dz. U. Z 2005 r., Nr 164, poz 1365, Dz. U. Z 2010 r., Nr 96, poz 620, Dz. U. Z 2010, Nr 182, poz 1228) i przedstawiam Radzie Naukowej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu wnioski o dopuszczenie mgr inż. Katarzyny Gębury do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie, z uwagi na znaczenie podjętej w rozprawie doktorskiej tematyki, rozległość i stopień trudności przeprowadzonych badań oraz znaczenie praktyczne wyników wnoszę dodatkowo o jej wyróżnienie.

Bytom 06.05.2018r.

**KIEROWNIK**  
Zakładu Profilaktyki Chorób Nowotworowych  
Wydziału Zdrowia Publicznego w Bytomiu  
Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach  
**dr hab. n. med. Sebastian Grosicki**