



KATEDRA I KLINIKA TRANSPLANTACJI SZPIKU,
ONKOLOGII I HEMATOLOGII DZIECIĘCEJ,
UNIwersytet Medyczny we Wrocławiu
PONADREGIONALNE CENTRUM ONKOLOGII
DZIECIĘCEJ

"PRZYLĄDEK NADZIEI"

ul. Borowska 213, 50-556 Wrocław

Sekretariat

Tel.: +71-733-2700

Fax: +71-733-2709

Wrocław, 6.05.2018

Dr hab. n med. Marek Ussowicz
Katedra i Klinika Transplantacji Szpiku,
Onkologii i Hematologii Dziecięcej
Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu

PAN - Instytut Immunologii	
Wpl. dnia	07-05-2018
L. dz.	236/2018

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr inż. Katarzyny Elżbiety Gębury

Tytuł rozprawy: Znaczenie ekspresji i polimorfizmu genu kodującego receptor dla czynnika stymulującego wzrost kolonii granulocytów (CSF3R) w przeszczepieniu komórek mobilizowanych ze szpiku do krwi obwodowej

Promotor: Prof. dr hab. Katarzyna Bogunia-Kubik

Promotor pomocniczy: Dr hab. Aleksandra Butrym

Przeszczepienie hematopoetycznych komórek macierzystych jest uznaną metodą leczenia chorób nowotworowych i nienowotworowych przy wykorzystaniu komórek autologicznych lub allogenicznych. Tradycyjne i pierwsze historycznie źródło komórek – szpik kostny – w ciągu ostatnich 2 dekad uległo marginalizacji i ustąpiło miejsca komórkom macierzystym pobieranym metodą aferez krwi obwodowej od pacjentów lub zdrowych dawców. Przyczynami tego zjawiska są wyższy uzysk, mniejsze ryzyko dla dawcy oraz łatwość opracowania, przechowywania i przetaczania materiału przeszczepowego. Kluczowym procesem warunkującym pozyskanie komórek z krwi obwodowej jest procedura mobilizacji – stymulowania szpiku kostnego do produkcji i peryferyzacji komórek macierzystych, która standardowo opiera się o stosowanie czynnika wzrostowego granulocytów (G-CSF) oraz zjawisko regeneracji mielopoetyzy po chemioterapii u leczonych pacjentów. Przedstawiona rozprawa doktorska przedstawia wyniki badań osi receptor G-CSF – wewnątrzkomórkowe szlaki sygnałowe, które odpowiadają za regulację funkcji komórek efektorowych (granulocytów i monocytów) umożliwiających peryferyzację komórek macierzystych.

Uważam dobór tematu za aktualny i istotny zarówno od strony badań poznawczych jak i zastosowania klinicznego.

Zawartość Rozprawy

Przedstawiona do recenzji praca liczy 105 stron i składa się z 7 rozdziałów oraz bibliografii. Podział rozprawy jest tradycyjny na Wstęp, Cel pracy, Materiał i Metody, Wyniki, Dyskusję, Podsumowanie, Wnioski, Streszczenia w językach polskim i angielskim i Piśmiennictwo. Praca została napisana starannie i przejrzysto, a jej układ nie budzi zastrzeżeń. Rozprawa jest wzbogacona o 15 tabel i 40 rysunków umieszczonych w tekście. Jakość i czytelność materiałów ilustrujących rozprawę jest bardzo dobra.

Wstęp

We wstępie autorka przedstawia zarys historii transplantacji komórkowych na świecie i w Polsce oraz omawia istotne dla pracy doktorskiej zagadnienia funkcjonowania szpiku, identyfikacji komórek macierzystych i sposobów leczenia metodą przeszczepiania. Autorka przytacza aktualne dane pokazujące dominujący trend pobierania komórek macierzystych krwi obwodowej, co uzasadnia wagę zagadnień badanych w dalszej części rozprawy. Za ciekawe i mające duże walory edukacyjne uważam podrozdziały omawiające stan aktualnej wiedzy dotyczącej mechanizmu mobilizacji komórek macierzystych i szlaku przekazywania sygnału zależnego od receptora G-CSF (CSF3R), które dowodzą dobrej orientacji w literaturze przedmiotu Autorki i uzasadniają kierunek przeprowadzonych przez Nią badań.

Cel

Cele pracy zostały starannie dobrane i przedstawione w jasny, i szczegółowy sposób. Cele pracy obejmowały badania związku poszczególnych etapów przekazywania sygnału w monocytach i granulocytach od oceny ekspresji błonowej receptora CSF3R, przez analizę polimorfizmów receptora CSF3R kończąc na ekspresji transkryptów genów kodujących wewnątrzkomórkowe białka współdziałające z badanym receptorem, a punktem końcowym w postaci efektywności mobilizacji i poprzyszczepową odnową hematologiczną.

Materiał i Metody

W rozdziale Doktorantka scharakteryzowała grupę badaną składającą się ze 105 pacjentów poddanych autologicznemu przeszczepieniu komórek macierzystych oraz 279 zdrowych, honorowych krwiodawców.

Metodyka w zakresie zastosowanych technik laboratoryjnych została opisana w sposób dokładny i szczegółowy, dowodząc znajomości wykorzystanych technik badawczych i pozwalając na ich odtworzenie. Autorka opisała w metodologii proces doboru poddanych analizie miejsc polimorficznych oraz podała uzasadnienie dla modyfikacji badań polimorfizmu rs3918021 w oparciu o uzyskane wyniki. Metodologia badań RQ-PCR wymagała istotnej pracy optymalizującej technikę, a w przypadku niemożliwości osiągnięcia prawidłowego efektu, Doktorantka wykorzystwała inne metody molekularne.

Interpretacja wyników

Analiza statystyczna została przeprowadzona z użyciem prawidłowo dobranych metod statystycznych.

Wyniki

Wyniki badań zostały przedstawione w sposób uporządkowany i przejrzysty. Doktorantka przedstawia wyniki analiz polimorfizmów CSF3R, stwierdzając brak ich związku z występowaniem chorób hematologicznych oraz z wydajnością mobilizacji i tempem odnowy hematologicznej. Występowanie wariantów polimorficznych CSF3R nie wykazało związku z ocenianą za pomocą cytofluorymetrii ekspresją błonową przed i w trakcie procedury mobilizacji. W dalszej części, Autorka przedstawia wyniki badań molekularnych oceniających ekspresję genów szlaku przekąźnikowego G-CSF w odpowiedzi na mobilizację, konkludując brak różnic pomiędzy osobami wykazującymi wyrzut komórek macierzystych oraz pozostałymi pacjentami. W przedstawionych w tabeli 15 wynikach ekspresji mRNA dla badanych genów, zainteresowanie budzą utrata korelacji pomiędzy CSF3R-STAT1 i pojawienie się korelacji pomiędzy STAT5B-SOCS3 w trakcie procesu mobilizacji komórek macierzystych wskazując na obecność mechanizmów regulacyjnych w zakresie wewnątrzkomórkowego przekazywania sygnału. Wyższa ekspresja STAT1 przed rozpoczęciem mobilizacji korelowała z niższą wydajnością mobilizacji komórek macierzystych oraz u pacjentów, którzy nie odpowiedzieli na podanie G-CSF stwierdzono znacząco wyższy poziom mRNA dla STAT3. Doktorantka stwierdziła związek zmiany ekspresji CSF3R i SOCS3 w trakcie mobilizacji oraz związku wartości względnych STAT3, STAT5A i SOCS3 po mobilizacji z szybszą odnową hematologiczną po przeszczepieniu. W kolejnej części Doktorantka przedstawia wyniki badań cytofluorymetrii przepływowej, odnotowując obserwacje wysokich wartości wyjściowych i spadku powierzchniowej ekspresji CSF3R w trakcie mobilizacji, co w przypadku neutrofilów miało związek z wyższą wydajnością mobilizacji.

Dyskusja

Dyskusja ma obiektywny i zdystansowany charakter w stosunku do uzyskanych przez Autorki wyników i odnosi je do wyników przedstawionych przez innych badaczy. Doktorantka wykazuje się zdolnością kojarzenia faktów i dobrą znajomością piśmiennictwa w postaci 110 odnośników literaturowych. Walorem piśmiennictwa jest jego trafny dobór wyczerpujący stan aktualnej wiedzy.

Wnioski w liczbie 7 wynikają z przeprowadzonych badań i odnoszą się do pytań postawionych w celach pracy.

Istotne elementy rozprawy i wkład Autorki

Do istotnych i oryginalnych elementów rozprawy zaliczam:

- rozległość badań - zastosowanie nowoczesnych i pracochłonnych metod badawczych. Praca obejmowała oznaczenia 5 polimorfizmów w 384 próbkach, badania RQ-PCR dla 7 genów z użyciem MGB SybrGreen i dla 2 genów z wykorzystaniem sond Taqman dla próbek pobranych od 50 pacjentów oraz badania cytofluorymetryczne 119 próbek krwi,
- doskonałą znajomość technik świadcząca o samodzielnym wykonaniu badań,

- praktyczną przydatność uzyskanych wyników. Doktorantka opisuje związek wzrostu ekspresji STAT3 w leukocytach z wydajnością mobilizacji komórek macierzystych oraz wyjaśnia wzrost ekspresji SOCS3 jako element modulacji szlaku sygnałowego zależnego od CSF3R.
- umiejętność poszerzenia badań i modyfikacji metodologii, jak to nastąpiło w przypadku polimorfizmów i ilościowych badań PCR.

Uwagi krytyczne

Poniżej przedstawiam główne uwagi krytyczne, które nasunęły mi się podczas lektury rozprawy.

- Przy parametrach elektorforezy agarozowej warto byłoby podać wartość zastosowanego pola elektrycznego w voltach na cm odległości między elektrodami.
- Określanie wartości liczby komórek CD34+ może być przeprowadzone w oparciu o różne protokoły cytometryczne jak np. ISHAGE, co ze względu na istotną rolę wyniku badania w wykonywanych analizach powinno zostać sprecyzowane w tekście.
- Określenie parametru wydajności w analizie statystycznej mobilizacji powinno zostać wykonane dla liczby komórek CD34+ w μL krwi, czyli dla wyniku określającego peryferyzację, ponieważ techniczne aspekty procedury aferezy komórek macierzystych są zmienne i zależne od zastosowanego urządzenia oraz zaprogramowanych parametrów dobranych przez operatora.
- W rozdziale 4.2 tempo odnowy hematologicznej leukocytów zależy nie tylko od jakości i składu komórkowego materiału przeszczepowego, ale też od dawki i terminów stosowania G-CSF po przeszczepieniu. Schemat podawania G-CSF powinien zostać podany i powinien być jednolity dla wszystkich przeszczepianych pacjentów.
- Istnieje rozbieżność w danych określających całkowitą liczbę zgromadzonych komórek macierzystych w tabeli 1 (średnia 6,1/mediana 4,9 mln/kg mc) oraz przytoczonym na stronie 62 wykorzystaniem do przeszczepienia „co najmniej 6 mln pozyskanych komórek CD34+ na kg masy ciała”.

Uwagi redakcyjne

Poniżej wymieniono zauważone usterki edytorskie.

- Na stronie 33 podano błędne odwołanie do Rysunku 5, zamiast do właściwego Rysunku 6.
- Na stronach 51 i kolejnych powinna być konsekwentnie stosowana oficjalna nazwa genu *CSF3*, ewentualnie alias nazwy *GCSF* zamiast skrótu nazwy kodowanego białka G-CSF.
- W rozdziale 4.3.4 (str.72) w 4 linijce od dołu powinno być „wzrost” poziomu mRNA zamiast „spadek” co wynika z rysunku 35.
- Na str. 87 w 15 linii z kontekstu wynika, że chodzi o aktywację STAT3 a nie STAT1.

Ponadto należy dokonać korekty błędów literowych.

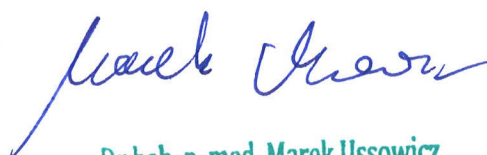
- Na str. 5 w wykazie anglojęzycznych skrótów powinno być „Hyaluronic Acid”, „Interferon” i „Natural Killer Cells”

- Na str. 37 powinno być „genotypu CT”
- Na str. 45 powinno być „High-Capacity”
- Na str. 53 powinno być Roche Diagnostics
- Na str. 58 w 4 linijce tekstu powinno być „paraformaldehydu”
- Na str. 64 podpis osi Y na Rysunku 28A powinien brzmieć „... krwi”
- Na stronie 81 powinno być „5`UTR” oraz „splicingowych”.

Przedstawione w niniejszej recenzji uwagi krytyczne, w głównej mierze mające charakter marginalny lub polemiczny, nie wpływają na moją bardzo wysoką ocenę przedstawionej rozprawy. Doktorantka wykazała się umiejętnością sformułowania i rozwiązania problemu badawczego, uzyskała wartościowe wyniki o znaczeniu praktycznym i przedstawiła dobrą znajomość prowadzonych badań, osiągnęła cele dając dowód umiejętności samodzielnego prowadzenia pracy naukowej.

Stwierdzam, że praca p.t. „Znaczenie ekspresji i polimorfizmu genu kodującego receptor dla czynnika stymulującego wzrost kolonii granulocytów (CSF3R) w przeszczepieniu komórek mobilizowanych ze szpiku do krwi obwodowej” jest oryginalnym i wartościowym dokonaniem Autorki, i spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim przez Ustawę o Stopniach i Tytule Naukowym obowiązującą aktualnie w Polsce. Mam zaszczyt i przyjemność przedstawić wniosek o dopuszczenie pracy do publicznej obrony. Jednocześnie, biorąc pod uwagę wysoki poziom recenzowanej rozprawy oraz dorobek naukowy Doktorantki, wnioskuję o wyróżnienie rozprawy doktorskiej.

Dr hab. n med. Marek Ussowicz



Dr hab. n. med. Marek Ussowicz
 Specjalista pediatrii, transplantologii klinicznej,
 onkologii i hematologii dziecięcej
 5458206