

Ocena rozprawy doktorskiej lek. Łukasza Szukalskiego pod tytułem:

„Analiza epigenetycznych modyfikacji DNA w leukocytach i moczu dorosłych pacjentów z ostrą białaczką szpikową (AML) oraz zespołami mielodysplastycznymi (MDS)”

Ostra białaczka szpikowa (AML) i zespoły mielodysplastyczne (MDS) to choroby charakteryzujące się złym rokowaniem, ciężkim przebiegiem oraz wysoką śmiertelnością. Ich etiopatogeneza pozostaje od wielu lat obiektem intensywnych badań. Dotychczas zidentyfikowano setki mutacji genowych pełniących potencjalną rolę w rozwoju AML, MDS, ale tylko części z nich przypisano wartość prognostyczną.

Metylacja DNA komórek hematopoetycznych pnia (HSC – *ang. Hematopoietic Stem Cells*) ma kluczowe znaczenie dla ich dojrzewania i różnicowania, ponieważ za jej pomocą wyciszane są geny odpowiedzialne za podtrzymanie ‘niedojrzałego statusu’ komórki macierzystej, a pobudzane do ekspresji są geny biorące udział w różnicowaniu konkretnych linii komórkowych z HSC. Procesem przeciwnym do metylacji cytozyny (CpG) jest demetylacja. Procesy te zostały szczegółowo omówione przez lek. Łukasza Szukalskiego w jego rozprawie doktorskiej. Podstawowym modyfikatorem epigenetycznym jest proces metylacji wysp CpG, bez którego różnicowanie komórek jest niemożliwe. Nadmierna metylacja wysp CpG jest zaś zaburzeniem typowym dla procesów nowotworowych, w tym, jak wykazano w niniejszej pracy – również ostrej białaczki szpikowej i zespołów mielodysplastycznych. Jak udowodniono i również szeroko opisano we wstępie do pracy, hipermetylacja będąca konsekwencją zaburzeń epigenetycznych prowadzi do leukemogenezy. Organizm wytworzył jednak zaawansowany system naprawczy, którego zadaniem jest wycinanie z DNA zmetylowanych cząsteczek cytozyny poprzez jej uprzednią oksydację. System ten określono mianem TET-TDG-BER-zależnej aktywnej demetylacji DNA, której aktywność prowadzi do usuwania z DNA i wydalania do moczu zdemetylowanych pochodnych 5-metylocytozyny, w czym kluczową rolę odgrywa dioksygenaza TET2 oraz glikozylaza TDG.. Ponieważ zidentyfikowano dotąd szereg czynników odpowiedzialnych za hipermetylację Doktorant uznał za zasadne wykonanie ich oceny, a także elementów systemu naprawczego i zależności pomiędzy nimi.

Jak dotąd przeprowadzono relatywnie niewiele badań nad rolą czynników epigenetycznych u chorych z ostrą białaczką szpikową i zespołem mielodysplastycznym, co więcej często wyniki tych badań są niespójne i niejednoznaczne.

Stąd też celami pracy lekarza Łukasza Szukalskiego były:

- A. Ocena procesów epigenetycznych u pacjentów dorosłych z ostrą białaczką szpikową (AML) oraz zespołami mielodysplastycznymi (MDS)- główny cel pracy. Cele szczegółowe dotyczyły
1. Analizy poziomów produktów aktywnej demetylacji w DNA leukocytarnym z krwi obwodowej dorosłych pacjentów z AML i MDS oraz grupy kontrolnej.
 2. Analizy stężeń produktów aktywnej demetylacji w moczu pacjentów dorosłych z AML i MDS oraz grupy kontrolnej celem oceny zaangażowania mechanizmów naprawczych modyfikacji epigenetycznych w tych grupach pacjentów.
 3. Analizy ekspresji mRNA genów zaangażowanych w procesy epigenetyczne w grupie pacjentów z AML i MDS oraz w grupie kontrolnej i ich wpływ na szlak TET-TDG-BER aktywnej demetylacji DNA.
 4. Oceny częstości występowania mutacji genów zaangażowanych w procesy epigenetyczne u pacjentów dorosłych z AML i MDS.
 5. Oceny wpływu wyjściowych poziomów produktów demetylacji w DNA leukocytarnym oraz stężeń tych produktów w moczu na dane kliniczne: ryzyko transformacji MDS do AML, odpowiedź na chemioterapię indukującą oraz długość życia pacjentów z AML.

Na przeprowadzenie badania lek. Łukasz Szukalski uzyskał zgodę Komisji Bioetycznej (uchwała nr: KB 404/2016).

Do badania włączono 62 chorych z nieleczoną AML oraz 42 pacjentów z nieleczonym MDS. U wszystkich chorych oznaczano wartości produktów aktywnej demetylacji w DNA leukocytarnym oraz w moczu, a do analiz wykorzystano dedykowaną metodologię opartą o dwuwymiarową ultrasprawną chromatografię cieczową z tandemową spektrometrią mas (2D UPLC-MS/MS). Wykonano także pomiary ekspresji mRNA genów *TET1*, *TET2*, *TET3*, *TDG*, *IDH1* oraz *IDH2*. Uzyskane wyniki porównywano do grupy kontrolnej (n=52). U wszystkich pacjentów oznaczono również status mutacji genów *TET2*, *IDH1* oraz *IDH2*. Grupę kontrolną stanowili ludzie zgłaszający się do Szpitala Uniwersyteckiego nr 2 im. Jana Biziela w Bydgoszczy celem uczestnictwa w narodowych programach przesiewowych chorób nowotworowych. W grupie kontrolnej wykluczono pacjentów z nowotworami, chorobami hematologicznymi oraz ciężkimi chorobami towarzyszącymi.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska obejmuje wraz ze streszczeniami, wykresami, rycinami i tabelami 110 stron wydruku komputerowego. Układ pracy przedstawiony w spisie treści jest poprawny.

We **wstępie** Autor szczegółowo omawia aktualny stan wiedzy na temat diagnostyki i leczenia AML i MDS ze szczególnym uwzględnieniem znanych czynników ryzyka oraz przede wszystkim czynników epigenetycznych i ich potencjalnego zastosowania w hematologii i onkologii.

Postawione **cele pracy** należy uznać za godne realizacji.

Pacjenci i metody stanowią kolejny rozdział, szczegółowo opisujący przebieg badania.

Wyniki podane są w osobnym rozdziale w formie graficznej i opisowej, pozwoliły one na sformułowanie następujących wniosków, które zostały przedstawione w sposób opisowy i stanowią odpowiedzi na postawione cele pracy:

1. Wykazano obniżenie poziomu 5-hmdC w DNA leukocytarnym pacjentów z AML względem grupy kontrolnej oraz pacjentów z MDS względem grupy kontrolnej.
2. Stwierdzono różnice w stężeniach produktów aktywnej demetylacji w moczu: najwyższe stężenia u pacjentów z AML, pośrednie u pacjentów z MDS oraz najniższe w grupie kontrolnej. Wykazano przez to różnice w nasileniu zaburzeń epigenomu | w tych grupach: największe wśród pacjentów z AML, pośrednie wśród pacjentów z MDS oraz najniższe w grupie osób zdrowych.
3. Wykazano zwiększoną ekspresję mRNA *TET1* oraz *TET3* w grupie pacjentów z AML względem grupy kontrolnej, co przy stwierdzonym jednocześnie spadku ekspresji *TET2* wspiera hipotezę zakładającą kompensacyjną funkcję genów *TET1* oraz *TET3* w odpowiedzi na deplecję *TET2*. Dodatkowo w grupie pacjentów z AML wykazano znacznie wyższą ekspresję mRNA genu *TDG* w stosunku do osób zdrowych, co odzwierciedla znaczne nasilenie procesów naprawczych zaburzeń metylacji przez TET-TDG-BER-zależną aktywną demetylację DNA w grupie chorych na AML.
4. Określono częstość występowania mutacji w genach *TET2*, *IDH1* oraz *IDH2* w populacji pacjentów z AML oraz MDS, zbieżną z danymi literaturowymi.
5. Wykazano, że poziomy produktów aktywnej demetylacji w DNA leukocytarnym oraz stężenia tych produktów w moczu pacjentów z AML nie mają wpływu na odpowiedź na leczenie chemioterapią intensywną. Pacjenci z MDS, u których doszło do transformacji do AML mieli niższy wyjściowy poziom 5-mdC w DNA

leukocytarnym niż pacjenci, u których nie doszło do transformacji. Wykazano, że pacjenci z AML z niskim wyjściowym stężeniem 5-mdC w moczu mieli dłuższe przeżycie całkowite, niż pacjenci z wysokim stężeniem 5-mdC.

W rozdziale **Omówienie wyników i dyskusji** Autor w sposób zwięzły i szczegółowy ocenia uzyskane przez siebie wyniki i porównuje je z rezultatami badań przeprowadzonych, opublikowanych przez innych lekarzy.

Piśmiennictwo jest bardzo rozbudowane, dobrane właściwie, w zdecydowanej większości pochodzi z ostatnich 10 lat.

Podsumowując ocenę rozprawy doktorskiej należy stwierdzić, że stanowi ona kolejny krok w ocenie zastosowania czynników epigenetycznych jako nowych czynników prognostycznych i predykcyjnych, wskazówek co do sposobu leczenia u chorych z ostrymi białaczkami szpikowymi i zespołami mielodysplastycznymi.

W pracy lekarz Łukasz Szukalski wykazał się znajomością warsztatu jakim powinien się posługiwać pracownik naukowy- lekarz. Na wyróżnienie zasługuje perfekcyjne wykorzystanie skomplikowanych metod statystycznych do opracowania uzyskanych wyników oraz perfekcyjna znajomość mechanizmów metylacji i demetylacji.

Zwraca uwagę fakt, że szereg uzyskanych rezultatów może stanowić podstawy do dalszych badań nad nowymi czynnikami prognostycznymi i predykcyjnymi w opisywanych przez Doktoranta jednostkach chorobowych.

W swojej pracy Doktorat potwierdził/ udowodnił/określił, że:

1. Jednym z czynników prowadzących do hipermetylacji mogą być mutacje genów *TET2*, *IDH1* oraz *IDH2*, które upośledzają proces TET-TDG-BER-zależnej aktywnej demetylacji DNA poprzez defekt enzymu przeprowadzającego reakcję oksydacji 5-mdC do 5-hmdC lub poprzez wytworzenie błędnego substratu dla przeprowadzanej reakcji.
2. Określił częstość występowania mutacji wymienionych genów u pacjentów z AML oraz MDS.

3. Wykazał głęboką deplecję ekspresji mRNA genu *TET2* w grupie chorych z AML oraz znalazł dowód potwierdzający mechanizm kompensujący zaburzenie ekspresji mRNA *TET2* (poprzez nadekspresję *TET1* i *TET3*).
4. Wykazał istnienie znacznie wyższych mian produktów aktywnej demetylacji DNA w moczu w grupie pacjentów z AML i MDS w stosunku do grupy kontrolnej i udowodnił, że zaburzenia epigenetyczne są znacznie bardziej nasilone w AML oraz MDS niż w grupie kontrolnej.
5. Potwierdził analizując ekspresję mRNA genu *TDG* odpowiedzialnego za aktywne usuwanie 5-fCyt i 5-caCyt z DNA, że proces aktywnej naprawy DNA jest najbardziej aktywny u chorych z ostrą białaczką szpikową.

Łącznie wyniki przedstawione w pracy dostarczyły dowodów wspierających hipotezę, że zaburzenia epigenetyczne są podwaliną dla procesu leukemogenezy.

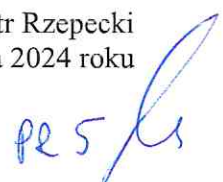
Na uwagę zasługują wnioski:

1. Poziomy produktów aktywnej demetylacji w DNA leukocytarnym oraz stężenia tych produktów w moczu pacjentów z AML nie mają wpływu na odpowiedź na leczenie intensywną chemioterapią.
2. Wyjściowy poziom 5-mdC w DNA leukocytarnym u pacjentów z MDS może mieć wartość prognostyczną w ocenie ryzyka transformacji do AML, a stężenie 5-mdC w moczu może wpływać na długość przeżycia całkowitego pacjentów z AML.

Ograniczenia pracy wskazał sam Autor, to stosunkowo mała liczebność niektórych grup badanych chorych uniemożliwiająca zastosowanie konkretnych metod analizy statystycznej oraz ograniczenia finansowe co do liczby wykonanych badań.

Pomimo istnienia tych niedoskonałości pracę oceniam bardzo pozytywnie ze względu na zaprezentowany materiał oraz istotne klinicznie refleksje nad nim.

Prof. dr hab. n. med.
Piotr Rzepecki
SPECJALISTA CHOROZB WEWNĘTRZNYCH
TRANSPLANTOLOGII KLINICZNEJ, HEMATOLOG
Nr. ZUS 7 7 7 6 8 5 9



Rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 13 ust. 1 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 późn. zm.) oraz art. 179 ust. 1 ustawy z dnia 3 lipca 2018r. Przepisy wprowadzające ustawę- Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1669 z późn. zm.).

Biorąc pod uwagę powyższe zwracam się zatem do Rady Dyscypliny Nauki Medyczne Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy o dopuszczenie lek. Łukasza Szukalskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie dziękuję za przywilej recenzowania tej pracy.

Prof. dr hab. n. med.
Piotr Rzepecki
SPECIALISTA CHOROÓB WEWNĘTRZNYCH
TRANSPLANTOLOGII KLINICZNEJ HEMATOLOGII
Nr. ZUS 7 7 7 6 8 5 9