

Ocena rozprawy doktorskiej mgr **Anny Wysoczańskiej-Klaczyńskiej**

p.t. " Polimorfizmy genu receptora witaminy D (VDR) a ryzyko zespołu metabolicznego u dzieci i młodzieży leczonych z powodu ostrej białaczki limfoblastycznej"

Ostra białaczka limfoblastyczna (acute lymphoblastic leukemia; ALL) należy do najczęstszych nowotworów złośliwych u dzieci, stanowiąc około 80% wszystkich białaczek wieku dziecięcego. Pod względem genetycznym jest ona nowotworem najlepiej zdefiniowanym. Odpowiedzialne za rozwój tej choroby są czynniki genetyczne, do których należą aberracje chromosomowe, takie jak $t(9;22)(q34;q11)$ prowadząca do powstania genu fuzyjnego *BCR-ABL1* oraz $t(4;11)(q21;23)$ związana z rearanżacją genu *MLL*. Najnowsze badania genetyczne wskazują na istnienie ważnych rokowniczo mutacji wpływających na przebieg choroby, do których zalicza się polimorfizmy w genach uczestniczących w metabolizmie karcinogenów, metabolizmie folianów czy też w genach naprawy jednoniciowych pęknięć DNA. Precyzyjne poznanie podłoża molekularnego ALL pozwoliło na zastosowanie terapii celowanej, prowadzącej niejednokrotnie do całkowitego wyleczenia choroby, ale obciążonej różnego stopnia toksycznością. Do najczęstszych działań niepożądanych chemioterapii należą zaburzenia hematologiczne, kardiologiczne, metaboliczne i endokrynologiczne.

W etiologii zaburzeń metabolicznych istotną rolę odgrywa receptor witaminy D (VDR) pełniący ważną rolę w działaniu aktywnej formy witaminy D. Niedobór witaminy D moduluje zmiany w genie *VDR* i prowadzi do istotnych konsekwencji o znaczeniu klinicznym. Jednym z czynników predykcyjnych rozwoju zespołu metabolicznego u pacjentów leczonych z powodu ALL jest polimorfizm genu *VDR*. Witamina D wykazuje plejotropowość działania, w związku z czym witamina ta i polimorfizmy genu jej receptora mogą uczestniczyć w rozwoju licznych zaburzeń metabolicznych w tym otyłości, cukrzycy, zaburzeń lipidowych i wydzielania insuliny. Dotychczas zidentyfikowano polimorfizmy genu kodującego receptor witaminy D oraz określono ich znaczenie w patogenezie zaburzeń masy ciała. Wpływ polimorfizmów genu *VDR* na częstość występowania zmian metabolicznych, szczególnie u dzieci nie jest jednak do końca poznany. Uzasadnione wydaje się zatem podjęcie przez mgr **Annę Wysoczańską-**

Klaczyńska badań dotyczących związku pomiędzy polimorfizmami genu *VDR* a ryzykiem wystąpienia zespołu metabolicznego u dzieci leczonych w przeszłości z powodu OBL. Jak wspomniałam wyżej, do istotnych klinicznie działań niepożądanych leczenia ALL u młodych pacjentów należą różnorodne zaburzenia przemiany materii. Analiza polimorfizmów genu *VDR* w odniesieniu do parametrów zespołu metabolicznego po zakończonym leczeniu ALL, może więc przyczynić się do lepszego poznania mechanizmów rozwoju tego zespołu i do trafniejszej oceny ryzyka jego wystąpienia. Badania te mają więc charakter poznawczy, ale prawdopodobnie będą miały w przyszłości także implikacje kliniczne.

Przedłożona mi do oceny rozprawa doktorska mgr **Anny Wysoczańskiej-Klaczyńskiej** p.t. **”Polimorfizmy genu receptora witaminy D (VDR) a ryzyko zespołu metabolicznego u dzieci i młodzieży leczonych z powodu ostrej białaczki limfoblastycznej”** liczy 104 strony maszynopisu i ma typowy dla rozpraw doktorskich układ, składając się ze spisu treści oraz rozdziałów zatytułowanych: Wprowadzenie, Cel pracy, Materiał i metody, Wyniki badań, Omówienie wyników badań i dyskusja, Podsumowanie, Wnioski, Piśmiennictwo oraz Streszczenie w języku polskim i angielskim. Całość uzupełniona jest wykazem skrótów oraz spisem 39 zawartych w tekście tabel i 12 rycin, które ułatwiają zapoznanie się z treścią pracy.

W rozdziale p.t. „Wprowadzenie” Doktorantka omówiła epidemiologię oraz zasady rozpoznawania i leczenia ALL. W graficzny sposób przedstawiła zasady klasyfikacji pacjentów do grup ryzyka oraz schematy leczenia ALL zgodnie z protokołem ALL IC-BFM z 2002 i 2009 roku. Kolejne podrozdziały poświęcone zostały następstwom leczenia ALL u dzieci, wśród których osobne miejsce zajął opis zespołu metabolicznego u pacjentów pediatrycznych. Ostatni podrozdział dotyczy wpływu polimorfizmów genu *VDR* na powstawanie zmian metabolicznych u dzieci leczonych w przeszłości z powodu ALL. Rozdział ten świadczy o dobrym przygotowaniu teoretycznym Doktorantki do poruszania się w trudnych zagadnieniach genetycznych i umiejętności łączenia ich z problemami klinicznymi, szczególnie zważywszy na fakt, iż Doktorantka nie jest z wykształcenia lekarzem. Autorka wykazała się ponadto umiejętnością krytycznego korzystania z piśmiennictwa naukowego. Uwagi, które mam do tej części pracy to pewne niezręczności językowe np. „ogóle przeżycie” zamiast całkowite przeżycie (str. 5), „przewlekła białaczka z dojrzałych limfocytów” zamiast przewlekła białaczka limfocytowa (str. 5), czy „poziom minimalnej choroby resztkowej (MRD)” zamiast stopień eradykacji MRD (str. 6). Zbędne jest również powtarzanie przez Doktorantkę objaśnień wcześniej już wyjaśnionych skrótów np. ostra białaczka limfoblastyczna (ALL) pojawia się kilkakrotnie, podobnie gen receptora witaminy D (gen *VDR*).

W rozdziale „Cel pracy” mgr **Anna Wysoczańska-Klaczyńska** przedstawiła cel badawczy, którym była ocena wpływu polimorfizmów genu *VDR* (rs731236 w allelu TaqI, rs1544410 w allelu BsmI, rs2228570 w allelu FokI i rs7975232 w allelu ApaI) na występowanie zaburzeń metabolicznych u dzieci leczonych w przeszłości z powodu ALL. Cel ten jest nowatorski oraz istotny z punktu widzenia poznawczego, a także klinicznego. Niewątpliwym nowatorstwem pracy była próba oceny związku pomiędzy polimorfizmami genu *VDR*, a wystąpieniem zespołu metabolicznego w tej szczególnej grupie osób, jakimi są dzieci i młodzież leczeni w przeszłości z powodu ALL, co nie było dotychczas przedmiotem doniesień w piśmiennictwie. Temat ten jest bardzo istotny klinicznie. Jak już wspomniałam, aktualnie stosowane protokoły leczenia tej białaczki zawierają leki powodujące zaburzenia metaboliczne zwłaszcza, glikokortykosteroidy nadnerczowe. Zbadanie, czy niektóre polimorfizmy genu *VDR* sprzyjają ujawnianiu się lub przedłużonemu utrzymywaniu się takich następstw leczenia cytostatycznego, może mieć bardzo duże znaczenie kliniczne. Oczekiwałabym tylko w tym rozdziale nieco szerszego rozwinięcia nie do końca dla mnie zrozumiałego określenia „różnice genetyczne genu *VDR*”.

W rozdziale „Materiał i metody” Doktorantka szczegółowo omówiła zastosowane metody badawcze, wśród których znalazły się badania biochemiczne oceniające parametry gospodarki węglowodanowej, lipidowej, jak również stężenie apolipoproteiny A1 i B oraz stężenie witaminy D w grupie badanej 92 osób w wieku od 5 do 30 lat oraz w grupie kontrolnej 89 osób zdrowych w porównywalnym wieku. Ponadto, u każdej osoby wykonano badania antropometryczne, uwzględniające masę ciała, wzrost, obwód pasa oraz BMI, jak również wykonano badania polimorfizmu genu *VDR* w allelach TaqI, BsmI, FokI i ApaI. W tym celu przeprowadzono izolację DNA, wykonano reakcję PCR, elektroforezę żelową, reakcję minisekwencjonowania polimorfizmu pojedynczych nukleotydów (SNaPshot) oraz elektroforezę kapilarną. Dobór zastosowanych metod badawczych, jak również analiz bioinformatycznych i statystycznych nie budzi zastrzeżeń. Jest on adekwatny do postawionych celów, a ich opis świadczy o dobrym opanowaniu przez Doktorantkę warsztatu badawczego. Moja drobna sugestia dotyczy podrozdziału pt.: „Cechy rozwoju zaburzeń metabolicznych wg IDF”, który moim zdaniem powinien znaleźć się we wstępie, a nie w rozdziale Materiał i metody. Doktorantka powinna również podać, jaki był odstęp czasu pomiędzy zakończeniem leczenia cytoredukcyjnego białaczki a rekrutacją pacjenta do badania.

W rozdziale zatytułowanym „Wyniki” Doktorantka przedstawiła uzyskane wyniki zarówno opisowo, jak i w formie 30 rozbudowanych tabel oraz 8 rycin. Autorka analizowała kolejno cechy zespołu metabolicznego z uwzględnieniem parametrów metabolicznych i

antropometrycznych w całej grupie badanej i grupie kontrolnej, jak również w podgrupach wyodrębnionych według płci i zastosowanych schematów leczenia ALL. Osobno analizowała wyniki pomiaru ciśnienia krwi w całej grupie badanej i kontrolnej poniżej 18r.ż., jak również z uwzględnieniem płci i protokołu leczenia. Kolejne wyniki dotyczyły porównania częstości występowania obniżonych, podwyższonych i prawidłowych wartości parametrów biochemicznych i antropometrycznych analizowanych w całej grupie badanej i kontrolnej, oraz z uwzględnieniem płci i protokołu leczenia. Doktorantka analizowała następnie częstość występowania prawidłowego i nieprawidłowego stężenia witaminy D w grupie badanej i kontrolnej, również uwzględniając płeć i schemat zastosowanego leczenia. Kolejny podrozdział dotyczył analizy częstości występowania cech zespołu metabolicznego, jak również oceny zależności pomiędzy stężeniem witaminy D, a występowaniem zespołu metabolicznego u osób w wieku powyżej 10 r.ż. Ostatnia część wyników dotyczyła częstości występowania alleli i genotypów badanych polimorfizmów w grupie badanej i kontrolnej. Moim zdaniem charakterystyka grupy badanej oraz grupy kontrolnej powinna raczej znaleźć się w rozdziale Materiał i metody, a nie w rozdziale Wyniki. Grupę badaną stanowiły dzieci w wieku poniżej 18 r.ż. , ale także osoby dorosłe w wieku powyżej 18 r.ż. W przedstawionych analizach nie znalazłam jednak porównania wyników pomiędzy obiema grupami wiekowymi. Istotne byłoby również umieszczenie informacji dotyczących zakresu wartości referencyjnych laboratorium, w którym były oznaczane parametry biochemiczne. Czy normy dla dzieci są identyczne z normami dla dorosłych? Na rycinach 5-8 błędnie opisano oś Y. Doktorantka, prawdopodobnie przez pomyłkę, zamiast odsetka osób w grupie badanej/kontrolnej wpisała tam stężenie witaminy D wyrażone w procentach. Na rycinie 5 zatytułowanej „Niedobór witaminy D” wyodrębniono grupy badaną i kontrolną, w których stężenie witaminy D wynosiło $>30\text{ng/ml}$ i $<30\text{ng/ml}$. Zgodnie jednak z tekstem umieszczonym nad ryciną, wartości stężenia witaminy D $<30\text{ ng/ml}$ są wartościami nieprawidłowymi i oznaczają niedobór (stężenie pomiędzy 20 - 30 ng/ml) lub deficyt (stężenie $<20\text{ ng/ml}$), natomiast wartości $\geq 30\text{ ng/ml}$ są wartościami prawidłowymi. Tak więc rycina 5 nie przedstawia niedoboru witaminy D, tylko porównanie odsetka osób w grupie badanej i kontrolnej z prawidłowym i obniżonym stężeniem witaminy D. Podobnie na rycinie 6 zatytułowanej „Deficyt witaminy D”, z jednej strony przedstawiono grupy badaną i kontrolną z deficytem witaminy D (stężenie $<20\text{ng/ml}$), z drugiej natomiast grupy, w których stężenie wynosiło $\geq 20\text{ng/ml}$. Były to więc osoby zarówno z niedoborem, jak i z wartościami prawidłowymi. W analizach polimorfizmu genu *VDR* Autorka używa z kolei podziału na niedobór witaminy D (stężenie $<30\text{ng/ml}$) i deficyt (stężenie $<20\text{ ng/ml}$) (str. 67, 70), podczas gdy wcześniej stężenie 20-30ng/ml określa jako niedobór, a wartości $<30\text{ng/ml}$

jako wartości nieprawidłowe. Pacjenci ze stężeniem witaminy D $<20\text{ng/ml}$ zaliczają się również do grupy ze stężeniem $<30\text{ng/ml}$. Przy przygotowywaniu badań do publikacji, proponuję precyzyjniejsze zdefiniowanie pojęć „niedobór, deficyt, nieprawidłowe stężenie”. Wyjaśnienia wymaga zastosowanie różnych progów wiekowych na potrzeby analizy różnych parametrów. I tak obwód pasa analizowano w grupie poniżej i powyżej 16 r.ż, ciśnienie tętnicze metodą Korotkowa z zastosowaniem siatek centylowych mierzono tylko u osób poniżej 18 r.ż, natomiast w tabeli 9 przedstawiono rozkład wieku i płci grupy badanej i kontrolnej stosując podział na trzy grupy wiekowe, poniżej 10 r.ż, pomiędzy 10-18 r.ż i powyżej 18 r.ż. Poza tymi uwagami nie mam zastrzeżeń do prezentacji wyników; ich kolejność jest logiczna i zgodna z postawionymi celami pracy.

W rozdziale „Omówienie wyników i dyskusja” Doktorantka omówiła uzyskane wyniki w szeroko zakreślonym kontekście danych literaturowych, poświęconych badanemu zagadnieniu oraz przedstawia ich własną interpretację. Uzyskane wyniki Doktorantka analizowała w sposób ostrożny i wyważony. Autorka odnosiła się kolejno do zaburzeń metabolicznych i stężenia witaminy D u osób leczonych z powodu ALL, a także stężenia witaminy D u chorych z rozpoznaniem zespołem metabolicznym. Osobno omówiła polimorfizmy genu *VDR* w kontekście ryzyka rozwoju zaburzeń metabolicznych w szczególności odnosząc się do najciekawszego, moim zdaniem, spostrzeżenia, że polimorfizmy receptora witaminy D, takie jak TaqI, BsmI i ApaI mogą predysponować do ujawnienia zespołu metabolicznego, ale nie mają wpływu na jego składowe u dzieci i młodzieży leczonych w przeszłości z powodu ALL, z wyjątkiem genotypu GC polimorfizmu BsmI, który wykazuje związek z obniżonym stężeniem frakcji HDL.

Kolejne rozdziały to Podsumowanie oraz Wnioski. Doktorantka przedstawiła 7 wniosków logicznie wynikających z uzyskanych wyników i odpowiadających postawionym celom pracy. Moim zdaniem wnioski 1, 2 oraz 4 należałoby raczej nazwać obserwacjami.

Rozprawę kończy Wykaz skrótów, Spis 122 pozycji piśmiennictwa ułożonych w kolejności cytowań, wśród których 84 pochodzi z ostatnich 10 lat, oraz Spis rycin i tabel oraz Streszczenie w języku polskim i angielskim. W niektórych pozycjach piśmiennictwa brakuje numerów stron (poz. 9, 38, 47, 59, 96, 108, 113).

Podsumowując stwierdzam, że przedłożona mi do oceny rozprawa doktorska mgr **Anny Wysoczańskiej-Klaczyńskiej p.t. "Polimorfizmy genu receptora witaminy D (VDR) a ryzyko zespołu metabolicznego u dzieci i młodzieży leczonych z powodu ostrej białaczki limfoblastycznej"** spełnia wszystkie ustawowe i zwyczajowe wymagania stawiane rozprawie na stopień naukowy doktora nauk medycznych. Przedstawione powyżej uwagi, poczynione z

obowiązku recenzenta, nie mają charakteru zarzutów merytorycznych i nie umniejszają mojej pozytywnej opinii na temat pracy, w której połączono aspekty kliniczne z badaniami z zakresu biologii molekularnej w kontekście oceny polimorfizmu genów, bardzo aktualnego obecnie w wielu dziedzinach medycyny. Praca stanowi oryginalne rozwiązanie przez Doktorantkę zagadnienia naukowego. Temat rozprawy jest nowoczesny, a sama praca stanowi oryginalne rozwiązanie przez Doktorantkę zagadnienia naukowego. Doktorantka wykazała się wiedzą teoretyczną, umiejętnością korzystania z piśmiennictwa naukowego, planowania badań naukowych i samodzielnego ich przeprowadzenia.

Mam więc zaszczyt i przyjemność wnioskować do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauk Farmaceutycznych Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu o dopuszczenie mgr Anny Wysoczańskiej-Klaczyńskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



prof.dr hab.med. Anna Korycka-Wołowicz