

Prof. dr hab. n. med. Mirosław Markiewicz

Rzeszów 12.06.2023

Zakład Hematologii, Instytut Nauk Medycznych

Kolegium Nauk Medycznych, Uniwersytet Rzeszowski

*Klinika Hematologii, Uniwersytecki Szpital Kliniczny  
im. Fryderyka Chopina w Rzeszowie  
ul. Szopena 2, Rzeszów 35-055*

### Ocena

**rozprawy doktorskiej lek. Izabelli Miśkiewicz-Migoń:**

***„ST2 i REG3alfa jako markery ostrej choroby przeszczep przeciwko  
gospodarzowi u dzieci poddanych procedurze allogenicznego przeszczepienia  
komórek hematopoetycznych”***

wykonanej w Klinice Transplantacji Szpiku, Onkologii i Hematologii Dziecięcej we  
Wrocławiu pod kierunkiem prof. dr. hab. n. med. Krzysztofa Kałwaka

W ciągu ostatnich kilku dekad w dziedzinie przeszczepiania krwiotwórczych komórek macierzystych dokonano znaczących postępów, mimo to jednak ostra choroba przeszczep przeciw gospodarzowi (aGVHD) nadal odpowiada za znaczną chorobowość i śmiertelność. Przewidzenie trajektorii przebiegu aGVHD umożliwiłoby podejście do zarządzania leczeniem w oparciu o stratyfikację ryzyka i odpowiednią terapię wyprzedzającą dla poszczególnych pacjentów, w celu poprawy uzyskiwanych wyników. Pozwoliłoby to na ograniczenie leczenia i zmniejszenie jego działań niepożądanych u osób z chorobą łagodną, natomiast wczesną intensyfikację leczenia u pacjentów, u których przewiduje się chorobę wysokiego ryzyka. Dla oszacowania ryzyka GVHD można wykorzystywać parametry kliniczne lub biomarkery krwi. Identyfikacja wiarygodnych biomarkerów w GVHD byłaby pomocna w umożliwieniu prostej stratyfikacji ryzyka, co wciąż stanowi wyzwanie dla lekarzy. Dotychczas zbadano wiele potencjalnych biomarkerów, ale obecnie żaden z nich nie jest szeroko stosowany w praktyce klinicznej, a wynika to głównie z braku walidacji w dużych prospektywnych badaniach klinicznych. Obiecujące biomarkery w aGVHD oceniane w badaniach w ostatnich latach obejmują supresor rakotwórczości-2 (ST2) i regenerujące białko pochodzące z wysepek 3- $\alpha$  (REG3 $\alpha$ ). Dlatego cenne i w pełni

uzasadnione jest podjęcie przez lek. Izabellę Miśkiewicz-Migoń badania obydwu tych czynników jako markerów aGVHD u dzieci. Na przeprowadzenie badania uzyskana została zgoda właściwej Komisji Bioetycznej, a jego koszty sfinansowano w ramach umowy z fundacją „Na Ratunek Dzieciom z Chorobą Nowotworową”.

Rozprawa doktorska liczy 88 stron tekstu, zawiera niezbędne rozdziały.

Streszczenie w języku angielskim powinno zostać uzupełnione o tytuł pracy.

Wstęp pracy, zawarty na 19 stronach, jest interesujący, przedstawia przegląd wiedzy związanej z tematyką badań i uzasadnia podjęte w rozprawie badania. Doktorantka przedstawiła elementarne informacje dotyczące przeszczepiania komórek krwiotwórczych, występujących powikłań i badanych biomarkerów. Nie ustrzegła się jednak od wielu pomyłek, wymagających korekty. W rysie historycznym utożsamienie początków transplantologii z początkami transfuzjologii wydaje się nieuprawnione, są to dziedziny odrębne, a przetaczanie to całkiem co innego niż przeszczepianie. Zabrakło też konsekwencji w przywołaniu pierwszego przeszczepienia: skoro w tekście rozdziału jest mowa o pierwszych przeszczepieniach szpiku dokonanych przez Jana Rosenbuscha-Raszka we Lwowie w 1938 r., nieściśle są informacje o tym, że pierwszego przeszczepienia szpiku dokonali trzej cudzoziemcy w 1939 r., a dalej że dokonał tego Donnall Thomas w 1957 r. Stwierdzenie, że użycie bomby atomowej zwiększyło wiedzę na temat transplantacji wydaje się zbyt daleko posunięte, niezależnie od dokonanych wówczas obserwacji wpływu promieniowania na szpik kostny. Pierwszy opis objawów odpowiadających GVHD powstał w wyniku badań przeprowadzonych na myszach, a nie na jednej myszy. Optymalnym dawcą jest rodzeństwo w pełni zgodne w układzie HLA, a nie całe biologiczne rodzeństwo pacjenta. Przeszczepione komórki, a nie kondycjonowanie wywołują reakcję przeszczep przeciwko chorobie. Nie istnieją „mniejsze antygeny HLA”, natomiast istnieją mniejsze antygeny zgodności tkankowej, nie są to jednak epitopy limfocytów T, tylko polimorficzne peptydy prezentowane po ich przyłączeniu do antygenów HLA receptorom limfocytów T. W przebiegu wątrobowej aGVHD, obok wzrostu bilirubiny częściej niż do zwyżki transaminaz dochodzi do wzrostu innych parametrów cholestatycznych, takich jak GGTP i FA. Jeśli w następnym zdaniu podana jest jednoznaczna definicja steroidoopornej GVHD, należy usunąć poprzednie zdanie informujące o tym, że nie ma takiej definicji.

W dalszej części rozprawy Autorka przedstawiła cel podjętych badań składający się z oceny punktów końcowych:

1. pierwszorzędowych: ocena związku między stężeniem ST2, REG3 $\alpha$  i sCD163 w osoczu pacjentów po przeszczepieniu a wystąpieniem aGVHD, steroidooporności, przeżyciem całkowitym i śmiertelnością nie związaną z nawrotem, oraz
2. drugorzędowych: ocena związku między stężeniem ST2, REG3 $\alpha$  i sCD163 w osoczu pacjentów po przeszczepieniu a wystąpieniem innych powikłań poprzyszczepowych bądź nawrotu.

Badanie antygenu sCD163, w przeciwieństwie do badań ST2 i REG3 $\alpha$ , nie było objęte zgodą komisji bioetycznej ani projektem naukowym i nie znajduje odzwierciedlenia w tytule pracy, dlatego nie powinno stanowić jednego z głównych celów ocenianej pracy. Na wcześniejszym etapie zapewne można było wystąpić o uzupełnienie zgody komisji bioetycznej i tytułu rozprawy, obecnie rozwiązaniem mogłoby być zawężenie podstawowego trzonu pracy do oceny dwóch biomarkerów.

W rozdziale Materiały i metody dowiadujemy się, że grupę badaną stanowiło 70 pacjentów leczonych przeszczepieniem allogenicznym komórek krwiotwórczych (allo-HSCT) w Klinice Transplantacji Szpiku, Onkologii i Hematologii Dziecięcej we Wrocławiu w latach 2020-2022. Stężenie badanych białek oceniane było za pomocą testu ELISA w osoczu uzyskanym z próbek krwi pobieranej w dniach +7 i +28 po allo-HSCT oraz w +1 dniu rozpoznania i w +7 dniu leczenia aGVHD. W analizie statystycznej Doktorantka zastosowała właściwe metody oceny prawdopodobieństwa zdarzeń oraz związku pomiędzy stężeniami badanych biomarkerów, a wybranymi zmiennymi jakościowymi i ilościowymi. Ich opis warto uzupełnić informacją o wartości p, którą Doktorantka przyjęła za istotną statystycznie.

W rozdziale Wyniki, liczącym 25 stron i składającym się z siedmiu podrozdziałów, Doktorantka przedstawiła wyniki analizy stężeń badanych białek w wybranych punktach czasowych, co odniosła do występowania aGVHD i innych powikłań, do czego wykorzystwała 16 spośród 19 zamieszczonych w pracy tabel i 7 rycin. Informacja o włączeniu do badania 70 pacjentów leczonych alloprzeszczepieniem została już podana w rozdziale Materiały i metody, powtórzenie jej w rozdziale Wyniki

jest niepotrzebne. Z kolei informację o wykonaniu badania HLA wysokiej rozdzielczości u wszystkich biorców i dawców, jeśli faktycznie u wszystkich badano HLA na poziomie allelicznym (w tekście mowa jest wyłącznie o antygenach HLA), warto uzupełnić o zakres i cel badania, jeśli dotyczyło całego HLA również u zgodnego rodzeństwa. Częstość występowania statusu CMV powinna być taka sama w tekście i w Tabeli: Biorca+/Dawca(-) 25,70% przypadków, pozostałe zakresy 37,15%, 20% i 17,15%. W przypadku nieznamiennego p nie ma potrzeby powtarzania za każdym razem komentarza, że prezentowane wyniki lub związki nie są istotne statystycznie, wystarczy wskazanie znamiennej wartości p w metodach statystycznych. Informacja o rodzaju narządowej postaci aGVHD została podana tylko dla 18 z 40 chorych, powinna być uzupełniona u pozostałych 22 chorych.

W Tabelach 8 i 10 powinny zostać dodane kolumny z wartością p, bez czego czytający nie ma możliwości samodzielnej weryfikacji zaistnienia bądź nie zaistnienia analizowanych zależności, ta sama uwaga odnosi się również do Rycin 1-4. W Tabeli 8 wątpliwość budzi podana mediana sCD163 w +28 dobie, wyższa dla wszystkich pacjentów łącznie niż mediana dla każdej z dwóch podgrup, zarówno bez aGVHD jak i z aGVHD. W Tabelach 9, 11-13 oraz 17-18 prezentacja samych wartości p nie umożliwia czytającemu dowiedzenia się, co było lub nie było znamienne: czy wzrost czy spadek stężenia danego biomarkera w przypadku wystąpienia bądź niewystąpienia analizowanego powikłania lub sytuacji klinicznej. Podobnie informacje dotyczące zaobserwowania różnic w stężeniach badanych biomarkerów pomiędzy pacjentami ze steroidooporną i steroidowrażliwą postacią aGVHD podane na str. 61 nie umożliwiają dowiedzenia się, na czym te różnice polegały, nie wiadomo też co przedstawiają prezentowane liczby i do czego odnoszą się wartości p w Tabeli 16. W Rycinach 2-4 brakuje jednostek stężeń badanych biomarkerów. Wątpliwość budzą mediany stężenia ST2 w dobie +28 w steroidoopornej versus steroidowrażliwej postaci aGVHD, które w tekście na str. 53 opisane są jako znamienne różne (74,3 tys vs 48,9 tys pg/ml), podczas gdy na Rycinie 4 wydają się mieć wartości tylko nieznacznie odbiegające od siebie. Opis próby zbudowania modelu regresji logistycznej powinien znaleźć się w rozdziale Materiały i metody w metodach statystycznych, a nie w rozdziale Wyniki.

W dyskusji Autorka wykazała umiejętność korzystania z aktualnego piśmiennictwa i porównania uzyskanych wyników z dotychczasową wiedzą. Nie

można zgodzić się ze stwierdzeniem zawartym w ostatnim akapicie dyskusji i powtórzonym we wniosku nr 2, iż do standardu postępowania należy wdrożyć przeprowadzanie oceny ST2 w punktach czasowych, które w dotychczasowych badaniach nie zostały przebadane (uwagę tą można odnieść do niewłączenia do standardów czegokolwiek niesprawdzonego).

Piśmiennictwo liczy 86 pozycji (w tym 29 czyli 1/3 z ostatnich pięciu lat, licząc od 2018 r.), które są zgodne z tematyką rozprawy. Sposób zapisu wszystkich 86 przywołanych pozycji piśmiennictwa nie odpowiada wymogom metodologicznym i wymaga ujednoczenia (podanie wszystkich, bądź ustalonej tej samej liczby pierwszych autorów, oryginalny tytuł bez kapitalików, skrótowa nazwa czasopisma, rok, tom, pierwsza i ostatnia strona publikacji).

Wnioski powinny być zwięźle sformułowane, odpowiadać na zaplanowane cele i opierać się na wynikach istotnych statystycznie.

Wnioski dotyczące pierwszorzędowych punktów końcowych:

1. Częściową odpowiedź na cel nr 1 znajdujemy we wniosku nr 1, w którym jest ona udzielona tylko w odniesieniu do określenia wpływu aGVHD na wzrost stężenia ST2 w dobie +28, odpowiedź należy uzupełnić w odniesieniu do stężenia REG3 $\alpha$  - jak wskazują wyniki, nie ulega ono zmianie.

Wniosek nr 2, zalecający wdrożenie do standardowego postępowania badania stężenia ST2 w określonych dniach, w których dotychczas nie zostało ono zbadane, powinien zostać usunięty jako nie odpowiadający na założone cele i nie potwierdzony badaniami będącymi przedmiotem dysertacji.

2. Analogicznie do celu nr 1, odpowiedź na cel nr 2 została udzielona we wniosku nr 3 w odniesieniu wyłącznie do wzrostu stężenia ST2 w steroidoopornej aGVHD, zatem należy ją uzupełnić w odniesieniu do stężenia REG3 $\alpha$ , które jak wskazują wyniki nie ulega zmianie.

3. Odpowiedź na cel nr 3 – ocena związku stężeń badanych biomarkerów z przeżyciem całkowitym - nie została udzielona we wnioskach, natomiast została umieszczona w wynikach, które wskazują na to, że związek taki nie występuje.

4. Analogicznie odpowiedź na cel nr 4 – ocena związku stężeń badanych biomarkerów ze śmiertelnością niezwiązaną z nawrotem – brak jej we wnioskach, natomiast informacja o wykazaniu braku związku znajduje się w wynikach.

Wnioski dotyczące drugorzędowych punktów końcowych:

We wniosku nr 4 udzielona została odpowiedź w odniesieniu wyłącznie do wzrostu stężenia ST2 u pacjentów z VOD, brakuje we wnioskach odpowiedzi dotyczącej związku stężeń ST2 z pozostałymi powikłaniami i związku stężeń REG3 $\alpha$  z powikłaniami. Jednak w rozdziale Wyniki odnajdujemy informację o występowaniu wzrostu biomarkerów w dniu +28 w przypadku niektórych powikłań: stężenia ST2 w powikłaniach krwotocznych, a stężenia REG3 $\alpha$  w zespole przesiąkania włóściczek.

Wniosek nr 5 powinien zostać usunięty, gdyż nie stanowi odpowiedzi na cele przeprowadzonych badań, może jedynie stanowić propozycję przedmiotu dalszych badań. Ponadto, część tego wniosku odnosząca się do stężenia ST2 podważa wiarygodność wniosku nr 1 (wpływ aGVHD na wzrost stężenia ST2 w dobie +28) i zawiera błędne uzasadnienie (skoro mediana wystąpienia aGVHD wynosiła 19 dni, to badanie w dniu +28 nie byłoby badaniem czynników rokowniczych prawdopodobieństwa wystąpienia aGVHD, tylko badaniem następstw zachorowania na aGVHD).

Podczas lektury pracy nasunęły mi się następujące (liczne!) uwagi redakcyjne:

- błędne skróty lub ich błędne rozwinięcia: *IBMRT* (powinno być: *IBMTR*) - str. 8, *Narodowy Instytut Zdrowia* (powinno być: *Instytuty*) - str.8, *OS - czas całkowitego przeżycia* (powinno być stosowane jednolicie: *przeżycie całkowite*) - str.8, *ds.* (w rozwinięciu *EBMT*) – str. 21;
- zapożyczenia językowe do usunięcia: *and* - str. 29, 75-83, *vedolizumab* (powinno być: *wedolizumab*) - str. 35, *p-value* - we wszystkich tabelach w których występuje wartość *p*;
- pominięcia: *możliwością* (powinno być: *z możliwością*) - str. 21, *w dobie +1* (powinno być: *w dobie +1 leczenia aGVHD*) - str.54, *ST* (powinno być: *ST2*) - str.61;
- błędy literowe, gramatyczne i składniowe: *and* w rozwinięciu *NRM* str. 17, *mogłyby* (powinno być: *mogłoby*)- str. 19, *w którym* (powinno być: *w której*) - str. 20, *został przeprowadzony* (powinno być: *zostało przeprowadzone*) - str. 21, *przeprowadzony* (powinno być: *przeprowadzona*) - str. 22, *bez lekarza* (powinno być: *przez lekarza*) - str. 24, *komórki* (powinno być: *komórek*) – str.24, *umożliwiła* (powinno być: *umożliwia*) – str.24, *wpływie* (powinno być: *wpływu*) – str. 25, *mniejszej ilości*

(powinno być: mniejsza liczba) – str. 25, *jirovecii* (powinno być: jiroveci) – str.27, *m3/dzień* (powinno być: ml/dobę) – str. 31-32, *pojawiania* (powinno być: pojawienie) – str. 35, *basilliksimab* (powinno być: bazyliksymab) – str. 35, *przedlaboratoryjnych* (powinno być: przedlaboratoryjnych) – str. 39, *poszczególnym* (powinno być: poszczególnych) – str. 41, *Tymoglobuline* (powinno być: Thymoglobulinę) – str. 42, *z wystąpieniem* (powinno być: a wystąpieniem) – str. 48 i 49, *z wystąpieniem* (powinno być: a wystąpieniem) – str. 63, *istotnie* (powinno być: istotnej) – str. 63, *dotyczącej* (powinno być: dotyczących) – str. 70, *oceny* (powinno być: ocena) – str. 71, *objętym* (powinno być: objętych) – str. 71;

- nieprawidłowa terminologia: *ilość komórek* (powinno być: liczba komórek) - str. 25, przewlekłe cGVHD (powinno być albo: przewlekłe GVHD, albo: cGVHD) – str. 29, *ilość przetoczonych komórek CD34+* (powinno być: liczba przeszczepionych komórek CD34+/kg) - str. 44, *szansa rozwoju aGVHD* (powinno być: ryzyko rozwoju aGVHD) – dwukrotnie na str. 57, 69, *ilość pacjentów* (powinno być: liczba pacjentów) - str. 68, *ilość limfocytów* (powinno być: liczbę limfocytów) - str. 72, *czynnikami przeżycia takimi jak OS i NRM* (powinno być: wskaźnikami przeżycia i umieralności takimi jak OS i NRM), str. 72;

- ujednolicenie terminologii i jej konsekwentne stosowanie w całej pracy: albo SOS albo VOD, przeszczep albo przeciw albo przeciwko gospodarzowi, białko ST2 a nie glikoproteina ST2, Komisja Bioetyczna a nie Komisja Bioetyki, steroidy a nie sterydy;

- uzupełnienie spisu skrótów o wszystkie brakujące a zastosowane w tekście: HLA, BM, CB, TCR, HIV, CMV, HTLV, EBV, ALL, AML, CML, HL, NHL, MDS, JMML, RT, HHV, ADV, BKV, HSV, VZV, RSV, SARS-CoV-2, HMPV, TNF, IL, TLR, NLR, MAGIC, sST2, Th2, GI-GVHD, C&RT, MPS I, LR, TNF $\alpha$ , TNFR1, HGF, MAP; usunięcie wszystkich rozwinięć i tłumaczeń skrótów występujących w tekście, w niektórych przypadkach powtarzających się wielokrotnie.

W podsumowaniu należy stwierdzić, że podjęta przez Doktorantkę problematyka badawcza jest niezmiernie aktualna. Obecnie trwają poszukiwania biomarkerów GVHD, które mogłyby służyć w przewidywaniu wystąpienia i przebiegu tego powikłania wciąż stanowiącego poważny problem kliniczny. Do chwili obecnej prowadzone badania nie doprowadziły jeszcze do ustalenia standardów

postępowania i wdrożenia badań biomarkerów do praktyki klinicznej. Tym bardziej każde nowe i oryginalne badanie biomarkerów jest ważne i zasługuje na docenienie. Założenia badawcze niniejszej pracy zostały sformułowane prawidłowo, oznaczanie stężeń biomarkerów zostało przeprowadzone w dobrze zaplanowanych punktach czasowych i przy użyciu właściwych testów. Umiejętnie zastosowano metody statystyczne i uzyskano wartościowe wyniki, pozwalające na udzielenie odpowiedzi na założone cele badawcze i na przypisanie pracy atrybutu nowości. Dlatego, pomimo wielu niedociągnięć szczegółowo wykazanych w recenzji, które powinny być zostać wyeliminowane na etapie przygotowywania i korekty manuskryptu i które niepotrzebnie zaniżają jego wartość, przedstawioną do oceny pracę oceniam pozytywnie.

Na podstawie oceny przedstawionej rozprawy stwierdzam, że rozprawa doktorska spełnia warunki określone w Art.187 ust. 1-4 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (tj. Dz. U. 2018 poz. 1668), to też wnoszę do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauki Medyczne Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu o dopuszczenie lek. Izabelli Miśkiewicz-Migoń do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

  
Prof. dr hab. n. med. Mirosław Markiewicz