

Dr hab. n. med. Sebastian Grosicki, prof. nadzw. SUM
Oddział Kliniczny Hematologii i Profilaktyki Chorób Nowotworowych w Chorzowie
Wydział Zdrowia Publicznego w Bytomiu
Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

Recenzja

rozprawy doktorskiej na stopień naukowy doktora nauk medycznych
lek. Marcina Sokołowskiego pt. "Analiza polimorfizmu genów kodujących białka
uczestniczące w szlaku nekroptozy w szpiczaku plazmocytowym".

Materiał do badania został zebrany w Specjalistycznym Szpitalu im. Doktora Alfreda Sokołowskiego w Wałbrzychu oraz Uniwersyteckiego Szpitala Klinicznego we Wrocławiu. Diagnostyka molekularna została wykonana w Zakładzie Immunologii Klinicznej przy Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN im. L. Hirszfelda we Wrocławiu.

Promotorem rozprawy doktorskiej jest Pani dr hab. n. med. Aleksandra Butrym.

Podstawę formalną wykonania recenzji stanowi pismo Dziekana Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu Pani Prof. dr hab. Małgorzaty Sobieszańskiej nr DL/N/2685/19.

Szpiczak plazmocytowy (MM) jest nowotworem hematologicznym o bardzo dużej zmienności w zakresie manifestacji klinicznej oraz cech laboratoryjnych, w tym genetycznych. Samo postawienie diagnozy bywa niekiedy trudne, a jeszcze trudniejsze bywa dobranie odpowiedniego postępowania terapeutycznego i później prowadzenie leczenia, które często przebiega z licznymi powikłaniami. Każde badanie w poszukiwaniu nowych parametrów, które mogą wykazać przydatność dla prowadzenia procesu diagnostyczno-terapeutycznego chorych na MM są bardzo cenne, zwłaszcza, że nowotworu tego praktycznie nie da się wyleczyć. Szczególnie cenne są badania nad nowymi cechami cytogenetycznymi lub molekularnymi, które biorą udział w patogenezie i mają wpływ na przebieg leczenia.

Przedstawiona mi do recenzji dysertacja doktorska lek. Marcina Sokołowskiego opiera się właśnie na takim badaniu. Doktorant postawił sobie za cel analizę występowania polimorfizmów w genach kodujących białka kluczowe dla procesu nekroptozy jak RIPK-1, RIPK-3 oraz MAPKAP2 oraz ocenę potencjalnych związków pomiędzy występowaniem zmienności genetycznej tych genów a zachorowalnością na szpiczaka plazmocytozowego i przebiegiem klinicznym choroby.

Tutaj muszę podkreślić oryginalność tego projektu. Opublikowanych badań dotyczących tego zagadnienia jest szczególnie mało.

W pierwszej części rozprawy doktorskiej opisano rys historyczny, a następnie epidemiologię, patogenezę, kryteria diagnostyczne, skale prognostyczne, czynniki prognostyczne, w tym zaburzenia genetyczne u chorych na MM, inne dyskracje plazmocytowe. Następnie zostały opisane sposoby postępowania terapeutycznego, w tym znaczenie dla efektu leczenia inhibitorów proteasomu, leków immunosupresyjnych, daratumumab, inhibitorów PD1, PD-L1 i PD-L2. Autor wrócił uwagę na różnice w postępowaniu terapeutycznym u chorych, którzy są kandydatami do AHST oraz tych, którzy nie mogą być leczeni z użyciem megachemioterapii. Należy podkreślić, że w tej tematyce doktorant poruszał się swobodnie zwracając uwagę na najważniejsze aspekty. Chciałbym jednak zwrócić uwagę na cytowane piśmiennictwo, które było w niektórych przypadkach dość przypadkowe i często opierało się na pracach przeglądowych. Przygotowując pracę do publikacji należy sięgnąć do prac źródłowych.

W dalszej części doktorant opisał zagadnienia związane z mechanizmami śmierci komórki takimi jak apoptoza i nekroptoza. Zrobił to w sposób zrozumiały i przejrzysty wprowadzając w dalszej części do celu pracy, który został jasno sprecyzowany.

W rozdziale Materiał i Metody opisał grupę badaną w liczbie 102 chorych z medianą wieku 66 lat odpowiadającą przeciętnej wśród chorych na MM. Zabrakło mi tutaj podania okresu w jakim materiał był zbierany. Już w tej części, jak również w dalszych rozdziałach dysertacji konsekwentnie doktorant nie podaje wartości odsetkowych, a jedynie liczby n poszczególnych podgrup badanych chorych, co utrudnia lekturę i bieżącą analizę pracy. Chorzy byli włączani do badania niezależnie od momentu leczenia i sposobu poprzedzającego leczenia, co w znacznym stopniu może utrudniać interpretację częstości powikłań obserwowanych w trakcie leczenia np. polineuropatii i następowe badania korelacji z obecnością polimorfizmów poszczególnych genów. Doktorant nie dysponował wynikami badań cytogenetycznych u badanych chorych, co stanowi znaczące ograniczenie wartości badania i może utrudnić opublikowanie jego wyników w wysoko indeksowanym czasopiśmie. Dla porównania częstości poszczególnych polimorfizmów genowych dobrano grupę kontrolną zdrowych ochotników, zrównoważoną pod kątem wieku i płci.

W dalszej części doktorant przeszedł do analizy występowania polimorfizmu genów kodujących trzy białka odgrywające istotną rolę w procesie nekroptozy: RIPK1, RIPK2, MAPKAPK2, które zostały wytypowane na podstawie danych literaturowych. Badania prowadzono za pomocą metody Real Time PCR przy użyciu komercyjnych dostępnych zestawów starterów i sond LightSNiP formy Tib Molbiol. Aspekty techniczne badań zostały opisane poprawnie. Metody statystyczne przyjęto i opisano w sposób prawidłowy.

Wyniki analizowano porównując częstość polimorfizmów w grupie badanej i kontrolnej, gdzie nie wykazano różnic.

Wykazano, że wariant polimorficzny AA dla *loci* RIPK3 rs724165 występował istotnie statystycznie częściej u kobiet niż u mężczyzn. Polimorfizm w *loci* rs9391981 dla genu *RIPK1* miał związek z liczbą płytek krwi.

Chorzy, u których wykazano obecność allelu AG dla *loci* rs2272990 w genie *RIPK1* charakteryzowali się wyższym stężeniem dehydrogenazy mleczanowej w surowicy i choć wartość nie była statystycznie istotna, wykazywała cechy trendu istotnego statystycznie. Wykazano, iż występowanie polimorfizmu dla *loci* rs724165 genu *RIPK3* ma związek ze stadium zaawansowania choroby wg. klasyfikacji Durie-Salmona w momencie rozpoznania szpiczaka plazmocytozy. Analiza wykazała, że istnieje związek ze zmiennością polimorficzną *loci* rs2272990 *RIPK1* a przeżyciem. Obserwowano istotne wydłużenie przeżycia całkowitego u chorych, u których występował wariant GG w stosunku do polimorfizmu AG (mediana: 29 miesięcy vs 15 miesięcy; $p=0,0284$). Podobne zależności obserwowano analizując czas wolny od progresji dla powyższego polimorfizmu (11 miesięcy vs 4,5 miesiąca; $p=0,0411$).

Wyniki dla *loci* rs3212243 genu *RIPK3* wykazały większe prawdopodobieństwo przeżycia u chorych noszących genotyp AA, którzy byli leczeni bortezomibem. W przypadku leczenia talidomidem wykazano istotne statystycznie wydłużenie mediany przeżycia całkowitego w przypadku chorych z genotypem GG w *loci* rs724165 *RIPK3*.

Stwierdzono także, iż u chorych nosicieli genotypu AA dla *RIPK3* rs3212243 toksyczność neurologiczna po bortezomibie i talidomidzie występowała istotnie statystycznie częściej, niż u pozostałych pacjentów.

W dalszej części badano wybrane czynniki wpływające na czas całkowitego przeżycia w grupie chorych z nowo rozpoznanym szpiczakiem plazmocytozy. Zabrakło tutaj wyników badań cytogenetycznych. Po analizie jednowariantowej do analizy wielowariantowej zakwalifikowano wiek (<65 lat vs ≥ 65 lat), stężenie hemoglobiny (≤ 10 g/dl vs > 10 g/dl), stężenie beta-2-mikroglobuliny (< 3mg/l vs ≥ 3 mg/l), *RIPK3* rs3212243 AA vs pozostałe warianty, *RIPK3* rs3212243 GG vs pozostałe warianty i obecność zmian osteolitycznych. Wykazano, że jedynie wariant GG polimorfizmu *RIPK3* rs3212243, wiek oraz B2M są niezależnymi czynnikami wpływającymi na przeżycie.

Dyskusja przeprowadzona w dysertacji jest ciekawa i świadczy o znajomości przez doktoranta zagadnień związanych z badaniami nad nekroptozą. Szczególnie zainteresował mnie związek występowania genotypu AA w *loci* rs724165 i rs3212243 (*RIPK3*) oraz GG dla rs45514798 (*MAPKAPK2*) z tendencją do polineuropatii w przebiegu leczenia chorych, co może być przydatne w praktyce klinicznej dla doboru terapii obciążonej mniejszym ryzykiem tego typu powikłań. Istotny może być też związek występowania niektórych polimorfizmów kodujących geny kodujące białka szlaku nekroptozy z dłuższym przeżyciem. Z uwagi jednak na niską liczebność badanej grupy wnioskowanie na ten temat powinno być ostrożne.

Rozprawa doktorska zakończona jest 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 116 stron wydruku komputerowego. Ma układ typowy, na który składają się strona tytułowa, spis treści, wykaz użytych skrótów, wstęp, cel pracy, materiał i metody, wyniki dyskusja, wnioski, piśmiennictwo obejmujące 203 pozycji aktualnego, ułożonego

alfabetycznie piśmiennictwa, wykaz 13 tabel, wykaz 19 rycin, streszczenia w języku polskim i angielskim.

Podsumowując chciałbym stwierdzić, że z dużym zainteresowaniem zapoznałem się z wynikami badań doktoranta, a następnie przygotowałem tą recenzję. Postawił on sobie bardzo ambitne i rozległe cele badawcze, które wymagały od niego wykorzystania zaawansowanych narzędzi laboratoryjnych. Badania mają charakter nowatorski, a uzyskane wyniki zachęcają do ich poszerzenia, co z pewnością może przekonać o ich praktycznej przydatności w pracy klinicznej. Pod względem edytorskim rozprawa została przygotowana starannie, choć autor nie ustrzegł się dość licznych błędów pisarskich i gramatycznych.

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 stawiane w art. 13 ust. 1 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 Wysokiej Radzie Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu wniosek o dopuszczenie lek. Marcina Sokołowskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Chorzów 02.09.2019r.

Prof. nadzw. dr hab. med. Sebastian Grosicki
HEMATOLOG
Specjalista chorób wewnętrznych
7067779

