

Recenzja  
rozprawy naukowej na stopień doktora nauk medycznych  
lek. med. Diany Magdaleny Frontkiewicz

**„Polimorfizm genów kodujących białka Ikaros i Aiolos  
w szpiczaku plazmocytowym „**

W przedstawionej mi do recenzji rozprawie doktorskiej lek. med. Diany Magdaleny Frontkiewicz postawiono za cel określenie zależności pomiędzy obecnością wybranych polimorfizmów (SNP – ang. single nucleotide polymorphism) w genach kodujących białka Ikaros i Aiolos działających poprzez szlak białka cereblon, a przeżyciem chorych na szpiczaka mnogiego, występowaniem niekorzystnych czynników prognostycznych oraz odpowiedzią na leki immunomodulujące stosowane w jego leczeniu. Na podstawie danych literaturowych Doktorantka wybrała do analizy następujące miejsca polimorficzne: rs413261, rs10272724 i rs61731359 genu *IKZF1* oraz rs907091 genu *IKZF3*.

Zagadnienie to jest niezmiernie ważne z praktycznego punktu widzenia. Włączenie do praktyki klinicznej tak zwanych „nowych leków” spowodowało istotne wydłużenie czasu życia pacjentów, którego mediana w ostatnich latach dochodzi do dziewięciu lat, przy trzech latach na początku ostatniej dekady ubiegłego wieku. Istotne znaczenie dla powyższego wydłużenia przeżycia miało wprowadzenie leków immunomodulujących. Są one obecnie podstawą kombinacji wielolekowych rekomendowanych przez krajowe i międzynarodowe grupy badawcze. Spośród powyższych leków najważniejsze znaczenie mają talidomid i lenalidomid, w mniejszym stopniu pomalidomid.

Jak wykazały wyniki opublikowanych badań leki immunomodulujące łącząc się z celebrenem, powodują modyfikację kompleksu ligazy ubikwitynowej E3 (CRL4CRBN), czego efektem jest działanie antyproliferacyjne i antyangiogenne. Kompleks leków immunomodulacyjnych oraz celebrenu powoduje ubikwitynację czynników transkrypcyjnych – Ikaros (IKFZ1) i Aiolos (IKFZ3), czego efektem aktywacja limfocytów T. Innym działaniem powyższego kompleksu jest hamowanie wzrostu komórek nowotworowych oraz ich apoptoza, między innymi poprzez redukcję stężenia czynnika transkrypcyjnego IRF-4. Ostatnie lata przyniosły doniesienia mówiące o tym, że ekspresja genu CRBN oraz obecność wariantów cereblonu mogą wpływać na skuteczność leków immunomodulujących. Przedstawiona mi do recenzji dysertacja wpisuje się w powyższe trendy badań.

Rozprawa doktorska lek. med. Diany Magdaleny Frontkiewicz ma układ typowy dla tego typu prac i obejmuje 98 stron, które zawierają: wstęp, omówienie celu pracy, opis materiałów i metod zastosowanych w trakcie badań, uzyskane wyniki, ich omówienie w dyskusji oraz wnioski. Całość poprzedzona jest wykazem zastosowanych w tekście skrótów. Uzupełnienie treści stanowią streszczenia w języku polskim i angielskim, alfabetyczny wykaz, który liczy przeszło 140 pozycji piśmiennictwa (które w dużej mierze zawiera najbardziej aktualne pozycje z ostatnich kilku lat), wykaz 27 tabel oraz 14 rycin zawartych w rozprawie.

We Wstępie Doktorantka sięga do historii medycyny, wyjaśnia, jak doszło do pierwszego opisanie choroby oraz jakie badania wspomagały pierwsze rozpoznania. Dalej podaje definicję choroby, opisuje przebieg kliniczny szpiczaka plazmocytozy oraz powszechnie stosowane systemy prognostyczne.

Następnie szczegółowo omawia patogenezę choroby oraz sposób działania leków stosowanych w jej leczeniu. Zrozumienie treści ułatwiają liczne ryciny. Końcowa część przedstawia definicję i znaczenie występowania polimorfizmów pojedynczych nukleotydów. Całość wstępu liczy 25 stron.

W osobnym rozdziale lek. Diana Frontkiewicz prezentuje trzy szczegółowe cele pracy, którymi były: analiza występowania polimorfizmu genów kodujących białka Ikaros i Aiolos (*IKZF1*, *IKZF3*) u chorych ze szpiczakiem mnogim, ocena korelacji parametrów klinicznych i znanych czynników rokowniczych z występowaniem zmienności genetycznej w powyższych genach oraz ocena występowania polimorfizmów genów kodujących *IKZF1* i *IKZF3* w korelacji z przebiegiem choroby oraz odpowiedzią na leczenie. Powyższe cele zostały sformułowane w sposób klarowny i przejrzysty.

Grupa badana i kontrolna zostały szczegółowo opisane w rozdziale Materiał i Metody. Do badań Doktorantka włączyła 125 osób (62 kobiety i 63 mężczyzn) leczonych w Klinice Chorób Wewnętrznych, Zawodowych, Nadciśnienia Tętniczego i Onkologii Klinicznej, Oddziale Onkologii Klinicznej i Poradni Hematologicznej Uniwersyteckiego Szpitala Klinicznego we Wrocławiu. Do grupy kontrolnej zakwalifikowano 100 zdrowych osób dopasowanych wiekiem i płcią. Charakterystyka grupy badanej jest szczegółowa, niestety należy zwrócić uwagę na brak wyników badań cytogenetycznych, które w chwili obecnej stanowią jeden z ważniejszych czynników rokowniczych.

Wybrane miejsca polimorficzne analizowano z wykorzystaniem dostępnych komercyjnie zestawów starterów i sond LightSNiP firmy Tib Molbiol (Berlin, Niemcy). Doświadczenie polegało na wykonaniu PCR w czasie

rzeczywistym (Real-Time PCR), po którym następowała analiza krzywej topnienia umożliwiającą identyfikację poszczególnych alleli i genotypów w badanych próbkach. Kwestie techniczne przeprowadzonych badań oraz dobór metod statystycznych zostały zaprezentowane w sposób prawidłowy.

Opis uzyskanych wyników został przedstawiony w dedykowanym rozdziale, który liczył 15 stron.

Odpowiadając na pierwszy z postawionych sobie celów doktorantka wyjaśniła, że obserwowane częstości alleli dla wszystkich analizowanych w badaniu SNPs były zbliżone do wyników zdeponowanych w serwisie dbSNP (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>). Nie znaleziono różnic w występowaniu miejsc polimorficznych rs4132601, rs10272724 i rs907091 pomiędzy grupą szpiczaka plazmocytozowego a grupą kontrolną.

Drugim z celów było znalezienie korelacji parametrów laboratoryjnych i znanych czynników rokowniczych z występowaniem badanych polimorfizmów. Udało się znaleźć szereg takich zależności: Doktorantka wykazała istnienie zależności pomiędzy stężeniem wapnia a występowaniem polimorfizmu w *loci* rs907091. Chorzy będący heterozygotami (CT) i homozygotami zmutowanymi (TT) mieli istotnie wyższe stężenie wapnia, niż pacjenci będący homozygotami wild – type (CC),  $p=0,0295$ . Znalazła też zależność pomiędzy stężeniem  $\beta$ 2mikroglobuliny, a obecnością wariantów genetycznych w rs4132601. Pacjenci będący heterozygotami (GT) i homozygotami zmutowanymi (TT) w rs4132601 mieli istotnie niższe stężenie  $\beta$ -2-mikroglobuliny, niż pacjenci będący homozygotami dzikimi (GG). Wykazała też, że pacjenci będący heterozygotami (GT) i homozygotami zmutowanymi (TT) dla rs4132601 mieli istotnie niższe średnie stężenie kreatyniny we krwi, niż chorzy będący homozygotami dzikimi (GG),  $p=0,0037$ , natomiast pacjenci będący

heterozygotami (GT) i homozygotami zmutowanymi (TT) w rs4132601 charakteryzowali się niższym średnim stężeniem białka całkowitego w surowicy krwi, niż pacjenci będący homozygotami dzikimi (GG),  $p=0,0212$ . W tym ostatnim przypadku cenne byłoby wyjaśnienie, czy niższy poziom kreatyniny wiązał się z niższym stężeniem łańcuchów lekkich w surowicy, czy też nie wynikał z aktywności choroby. Zaobserwowała także trend statystyczny ( $p=0,079$ ) do niższego poziomu albuminy u pacjentów z allelem T w rs907091 (CT, TT) niż u chorych bez tego allelu. W przypadku heterozygot (CT) i homozygot zmutowanych (TT) rs907091 istniała tendencja do niższych wartości aktywności dehydrogenazy mleczanowej niż u homozygot dzikich (CC). Autorka rozprawy wykazała, że chorzy w stadium zaawansowania choroby I i II wg Durie-Salmona mają statystycznie istotnie niższą aktywność dehydrogenazy mleczanowej niż chorzy z zaawansowaniem choroby w stadium III, niezależnie od występowania badanych alleli. Obserwacja ta, choć wykracza poza przyjęte cele, jest zgodna ze spostrzeżeniami, które posłużyły do stworzenia klasyfikacji ISS.

Trzecim celem pracy było znalezienie korelacji pomiędzy badanymi SNP (*IKZF1* - rs4132601 T>G i *IKZF3* rs907091 C>T). Powyższe poszukiwania zakończyły się niepowodzeniem. Wykazano co prawda związek obecności allelu G w rs4132601 T>G z przeżyciem całkowitym, ale wobec braku korelacji z odpowiedzią na leczenie oraz przeżyciem bez progresji choroby wydaje się, że korelacja ta nie ma związku ze stosowaniem leków immunomodulujących i na obecnym etapie jest trudna do wyjaśnienia.

W rozdziale „Dyskusja”, obejmującym 10 stron, lek. med. Diana Magdalena Frontkiewicz podjęła się omówienia uzyskanych w swojej pracy wyników badań oraz ich konfrontacji z pracami innych autorów. Doktorantka

swobodnie porusza się w terminologii omawianych zagadnień i uzasadniając tematykę podjętych badań, płynnie przechodzi do przedstawienia uzyskanych wyników w świetle dostępnej wiedzy literaturowej wykazując się biegłością przy korzystaniu z piśmiennictwa. Uwagę recenzenta zwraca fakt, że przytaczane pozycje z piśmiennictwa odnoszą się prawie wyłącznie do stosowania lenalidomidu pomijając badania wykorzystujące talidomid. Grupa chorych leczonych talidomidem stanowiła przeszło 2/3 całej analizowanej populacji.

Rozprawę wieńczy 6 dobrze udokumentowanych wniosków, które odpowiadają założonym na początku celom.

Podsumowując należy zaznaczyć, że przedstawione wcześniej krytyczne uwagi nie umniejszają wysokiej jakości przedstawionej mi do oceny dysertacji doktorskiej, która ma istotny charakter poznawczy, znaczące możliwości zastosowania w praktyce klinicznej oraz stanowi oryginalne rozwiązanie zadania naukowego. Praca spełnia wszystkie wymogi stawiane rozprawom na stopień doktora nauk medycznych (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.).

Mam przyjemność przedstawić pozytywną recenzję pracy doktorskiej i skierować do Wysokiej Rady Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu wniosek o dopuszczenie lek.med. Diany Magdaleny Frontkiewicz do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

*Diana Frontkiewicz*  
*Grygi*