



Recenzja rozprawy na stopień doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu

lekarz Joanny Roguskiej

pt.: „Wpływ polimorfizmów genu *SIRT1* i ekspresji białka sirtuiny 1 na zaburzenia gospodarki węglowodanowej i lipidowej u osób leczonych z powodu ostrych białaczek w okresie dzieciństwa i młodzieńczym.”

Ostra białaczka limfoblastyczna jest jedną z najczęściej występujących chorób nowotworowych w populacji dziecięcej. Leczenie onkologiczne wdrażane jest zazwyczaj szybko, a terapia charakteryzuje się wysoką skutecznością. Większość dzieci, u których rozpoznano ALL w dzieciństwie, dożywa wieku dorosłego, wyleczalność sięga ponad 80%. Wielu pacjentów jednak na przestrzeni lat boryka się z wczesnymi i późnymi następstwami leczenia onkologicznego. W tej grupie osób występują zaburzenia metaboliczne gospodarki węglowodanowej i lipidowej, problemy z ciśnieniem tętniczym krwi, zmiany w funkcjonowaniu przysadki, tarczycy, gonad, a także zaburzenia mineralizacji tkanki kostnej, co może mieć wpływ na stan zdrowia i dalsze życie pacjentów. Powikłania wynikają między innymi z toksyczności leczenia cytostatycznego oraz długotrwałych zmian metabolizmu w wyniku terapii ALL. Polimorfizmy genu *SIRT1* i białko sirtuina1 biorą udział w regulacji glikemii i lipidogramu w organizmie.

W związku z powyższym temat podjęty przez lekarz Joanny Roguskiej wpisuje się znakomicie w potrzeby działań naukowych środowiska medycznego – jest ważny i aktualny. Praca powstała w wiodącym ośrodku polskim, o wieloletniej tradycji badań objętych tematem, znanym z rzetelności i innowacyjności realizowanych badań.

Praca lekarz Joanny Roguskiej ma typowy układ rozprawy doktorskiej. Liczy w sumie 155 stron. Rozpoczyna się od spisu treści, następnie zawiera szczegółowy wstęp, cele pracy, precyzyjny opis metodyki przeprowadzonych badań, opis wyników, dyskusję, wnioski, streszczenie po polsku oraz po angielsku, wykaz stosowanych skrótów, piśmiennictwo (178 pozycji, głównie anglojęzyczne). Praca została przygotowana wzorowo od względem edytorskim, aczkolwiek w spisie treści zabrakło odnośników do stron w tekście głównym. Doktorantka nie załączyła również wykazu tabel i rycin, zwyczajowo obecnych w tego typu opracowaniach.

We wstępie, liczącym 17 stron, autorka omówiła główne problemy związane z podjętą tematyką. Dziękując wstęp na podrozdziały opisała kolejno: 1. Białko sirtuiny 1 – charakterystykę i funkcje w organizmie. 2. Zespół metaboliczny – kryteria rozpoznania u dorosłych i dzieci, a w kolejnych częściach opisała dokładnie zaburzenia gospodarki węglowodanowej, lipidowej, problem

nadciśnienia tętniczego krwi oraz otyłości. 3. Polimorfizmy genu *SIRT1* związane z zaburzeniami warunkującymi zespół metaboliczny. Kolejną część wstępu stanowi przejrzysty przegląd problematyki ostrej białaczki limfoblastycznej – kryteria diagnostyczne, charakterystyka, rokowanie i kolejno leczenie ostrej białaczki limfoblastycznej, charakterystyka preparatów diabetogennych stosowanych w leczeniu ostrej białaczki limfoblastycznej, wczesne i późne następstwa leczenia ALL oraz potencjalne możliwości terapeutyczne sirtuiny1. Uważam, że ta część wstępu może zostać wykorzystana jako praca pogładowa, aby z wieloma nowymi informacjami mogła zapoznać się większa liczba zainteresowanych.

Przedstawione jasno i precyzyjnie cele pracy wynikają z wyczerpującego wstępu. Celem głównym pracy była ocena wpływu polimorfizmów genu *SIRT1* i białka sirtuiny1 na zaburzenia gospodarki węglowodanowej i lipidowej u pacjentów leczonych z powodu ALL w okresie dzieciństwa i młodzieńczym z uwzględnieniem polimorfizmów genu *SIRT1* i stężenia białka sirtuiny1 w surowicy. Cele szczegółowe objęły: 1. Analizę indywidualnych czynników ryzyka rozwoju zaburzeń gospodarki węglowodanowej i lipidowej u pacjentów leczonych z powodu ostrej białaczki limfoblastycznej 2. Wykazanie, czy występuje zależność ryzyka rozwoju zaburzeń gospodarki węglowodanowej i lipidowej u pacjentów leczonych z powodu ostrej białaczki limfoblastycznej, wynikających z zastosowanego leczenia onkologicznego oraz przebiegu choroby. 3. Ocenę stanu zdrowia pacjentów przynajmniej rok po zakończonym leczeniu ostrej białaczki limfoblastycznej z uwzględnieniem parametrów antropometrycznych: masy i wysokości ciała oraz ciśnienia tętniczego krwi i obwodu pasa. 4. Wykonanie badań laboratoryjnych (OGTT z insuliną, lipidogram z podziałem na frakcje i z uwzględnieniem apolipoprotein A i B, morfologii krwi, białka CRP). Ocenę stężenia we krwi białka sirtuiny 1. 5. Analizę występowania wybranych polimorfizmów genu *SIRT1* u pacjentów przynajmniej rok po zakończonym leczeniu onkologicznym ze względu na prezentowane nieprawidłowości gospodarki węglowodanowej i lipidowej oraz u osób bez nieprawidłowości.

Lekarza Joanna Roguska przeprowadziła badanie w grupie 89 osób, przynajmniej rok po zakończeniu leczenia ALL i 49 osób kontrolnych dobranych losowo w podobnym wieku. Klarownie przedstawiła kryteria włączenia i wykluczenia z badania. Bardzo szczegółowo opisała sposób rekrutacji pacjentów do poszczególnych grup. Badanie obejmowało badanie lekarskie (podmiotowe i przedmiotowe) z pomiarem parametrów antropometrycznych (wysokość ciała wyrażoną w centymetrach, masę ciała wyrażoną w kilogramach, BMI, ciśnienie tętnicze wyrażone w mmHg). Wykonano badania biochemiczne: doustny test tolerancji glukozy (OGTT) z insuliną, stężenia białka sirtuiny1, stężenia hemoglobiny glikowanej, stężenia c-peptydu, lipidogramu (cholesterol całkowity, LDL, HDL, trójglicerydy), stężenia apolipoproteiny A, stężenia apolipoproteiny B, morfologii z rozmazem, stężenia białka C-reaktywnego. Wyliczono wskaźniki HOMA i QUICKI. Wykonano badania genetyczne 6 polimorfizmów genu *SIRT1*: rs 2273773, rs 12778366, rs 10509291, rs 7895833, rs 1082313 oraz rs 932658. Szczegółowość opisanej metodyki zasługuje na najwyższe uznanie. Uzyskane wyniki z przeprowadzonych badań poddano analizie statystycznej. Doktorantka zastosowała do obliczeń liczne, nowoczesne metody statystyczne, adekwatnie do badanych zmiennych i rozwiązywanych problemów.

Rozdział wyniki (65 stron) kolejno opisuje przeprowadzone analizy, zgodnie z omówionymi we wstępie problemami. Doktorantka podsumowuje wyniki w jasno i przejrzysto opracowanych i przemyślanych tabelach. Rozdział wyniki jest zdaniem recenzenta nieco zbyt obszerny, aczkolwiek imponujący w merytorycznej treści. Bez uszczerbku dla całości pracy można byłoby zrezygnować z

części bardzo szczegółowych analiz. Natomiast te najbardziej istotne wyniki warto z kolei było przedstawić graficznie w postaci czytelnych rycin, których niestety zabrakło. Główne wyniki przeprowadzonej analizy, wykazały w grupie badanej istotnie wyższe stężenie białka sirtuiny1 w surowicy krwi żyłnej w porównaniu do grupy kontrolnej. Istotnie wyższe stężenie glukozy w 120 min OGTT, stężenie cholesterolu całkowitego, LDL i trójglicerydów, istotnie niższe stężenie cholesterolu HDL wykazano u osób badanych aniżeli kontrolnych. Istotnie wyższe stężenie sirtuiny 1 występowało u osób z grupy badanej z prawidłowymi wartościami skurczowego oraz rozkurczowego ciśnienia tętniczego aniżeli u osób grupy kontrolnej z prawidłowym ciśnieniem skurczowym i rozkurczowym. Dla polimorfizmu genu rs2273773, lekarz Joanna Roguska określiła występowanie dwóch genotypów TT i TC w grupie badanej i kontrolnej. W grupie badanej z genotypem TT w porównaniu do grupy kontrolnej z genotypem TT stwierdziła istotnie wyższe stężenie białka sirtuiny1 oraz wyższe stężenie trójglicerydów (%). Dla polimorfizmu genu SIRT1 rs12778366, określono występowanie dwóch genotypów TT i TC w grupie badanej i kontrolnej. Stężenie sirtuiny 1 było istotnie wyższe w grupie badanej niż w grupie kontrolnej w obu genotypach TT i TC. Wśród osób z genotypem TC doktorantka wykazała wyższe stężenie trójglicerydów (%) w grupie badanej aniżeli w grupie kontrolnej. Dla polimorfizmu genu rs10509291, określiła występowanie dwóch genotypów TT i TA w grupie badanej i kontrolnej. W grupie badanej z genotypem TT w porównaniu do grupy kontrolnej z genotypem TT istotnie wyższe było stężenie sirtuiny 1, wyższe stężenie trójglicerydów (%), oraz procentowe stężenie cholesterolu LDL(%). W polimorfizmie genu SIRT1 rs1082313, określono 3 genotypy: AA, AG i GG, nie stwierdzono istotnych różnic parametrów biochemicznych. W polimorfizmie genu SIRT1 rs932658, określono 3 genotypy: AA, CA i CC, nie stwierdzono istotnych różnic parametrów biochemicznych. W polimorfizmie genu SIRT1 rs7895833, określono 2 genotypy: AA i AG. U wszystkich osób grupy badanej (genotyp AA oraz AG) stwierdzono istotnie statystycznie wyższe stężenie białka sirtuiny 1 w stosunku do osób grupy kontrolnej prezentujących genotyp AA. W grupie badanej o genotypie AA w porównaniu z grupą kontrolną (genotyp AA oraz AG) wykazano istotnie wyższe stężenie cholesterolu LDL (%). W grupie badanej u osób o genotypie AG w porównaniu z grupą kontrolną (genotyp AA oraz AG) wykazano istotnie wyższe stężenie trójglicerydów(%). Zdaniem lekarz Joanny Roguskiej wyższe stężenie sirtuiny 1 w organizmie osób po zakończonym leczeniu ALL sugerowałby ich zmniejszone ryzyko rozwoju hiperglikemii i insulinooporności. Nie potwierdzają tego wyniki przeprowadzonych przez doktorantkę badań. Może to sugerować, że stosowane w terapii leki onkologiczne wpływają na efekty działania SIRT1 poprzez inaktywację lub trwałą zmianę właściwości badanego białka sirtuiny1, bądź szlaków przez nie regulowanych. Wysokie stężenie sirtuiny1 wykazuje również działanie protekcyjne w rozwoju chorób nowotworowych, a tym samym zaburzeń metabolicznych związanych z tymi chorobami. Wyniki przeprowadzonych przez doktorantkę badań nie potwierdziły tych zależności, co wydaje się związane z utratą właściwości ochronnych sirtuiny lub nieprawidłowy jej metabolizm u osób po leczeniu ALL.

Przedstawione przez doktorantkę obserwacje to pierwsze doniesienie o roli polimorfizmów genu SIRT1 i białka sirtuiny1 w regulacji gospodarki węglowodanowej i lipidowej osób leczonych z powodu ALL. Nie analizowano dotąd czynników związanych z ALL, wczesnymi i odległymi następstwami choroby oraz genetyczną zmiennością genu SIRT1

W bardzo interesującej, liczącej 27 stron, dyskusji lekarz Joanna Roguska obiektywnie odnosi się do wyników innych autorów. Wiarygodnie interpretuje swoje wyniki i konfrontuje je z wynikami badań nieraz sprzecznych. Dyskusję czyta się bardzo dobrze, autorka wydzieliła podrozdziały, zatytułowane zgodnie z częściami omawianych wyników. Bardzo ułatwia to zrozumienie całości pracy i podążanie

za myślą naukową doktorantki. Cała dyskusja świadczy o dojrzałości naukowej Doktorantki i umiejętności interpretacji własnych wyników badań i planowania kolejnych.

Z przeprowadzonych badań doktorantka wyciągnęła wnioski, realizując wszystkie postawione sobie zadania. 1. U pacjentów grupy badanej w stosunku do grupy kontrolnej odnotowano wyższe stężenie sirtuiny1 we krwi, co może być wynikiem odpowiedzi organizmu na stres oksydacyjny związany z terapią onkologiczną osób leczonych z powodu ostrej białaczki limfoblastycznej. 2. Wysokie stężenia białka sirtuiny1 nie wykazuje właściwości ochronnych i normalizujących gospodarkę węglowodanową i lipidową u pacjentów leczonych z powodu ALL, co przemawia za istnieniem dodatkowych mechanizmów modyfikujących działanie sirtuiny1. 3. Pacjenci grupy badanej wykazują zwiększone ryzyko rozwoju zespołu metabolicznego w porównaniu do osób grupy kontrolnej. Sugerują to stwierdzone nieprawidłowości gospodarki węglowodanowej, lipidowej oraz wartości badanych parametrów antropometrycznych. 4. Stosowanie nowocześniejszych protokołów leczniczych w terapii ALL (użycie schematu ALL IC 2009 w porównaniu do schematu ALL IC 2002) prowadzi do zmniejszenia ryzyka wystąpienia zaburzeń metabolicznych, co potwierdziły wyniki przeprowadzonych badań. 5. Wskazane jest wykonywanie badań wybranych polimorfizmów genu SIRT1 celem zmniejszenia ryzyka występowania zaburzeń metabolicznych u pacjentów leczonych z powodu ALL. Należą do nich polimorfizmy rs 10509291, rs 2273773, rs 12778366, rs 10509291 oraz rs 7895833. Stwierdzenie ich obecności i możliwość wdrożenia profilaktyki rozwoju zaburzeń metabolicznych może poprawić jakość życia jak i jego długość u pacjentów leczonych z powodu ALL w okresie dzieciństwa i młodości.

Wnioski odpowiadają na pytania postawione w celach rozprawy oraz wyczerpują postawiony problem badawczy. Pracę czyta się sprawnie, styl i organizacja tekstu pozwalają na szybkie poruszanie się po poszczególnych jej częściach, wszystkie dane są przedstawione ciekawie. Czytelne tabele ilustrują opisane wyniki. Poczynione uwagi krytyczne w niczym nie umniejszają wartości pracy. Całość pracy, przeczytałam z ogromnym zainteresowaniem, jej treść świadczy o dojrzałych umiejętnościach Doktorantki dotyczących planowania i realizacji zadań badawczych oraz wyciągania prawidłowych wniosków. Niewątpliwie stanowi oryginalne rozwiązanie podjętego problemu naukowego. Recenzent jest pod wielkim wrażeniem skrupulatności nie tylko w projektowaniu i realizacji zamierzonych celów badawczych Doktorantki, ale także w przedstawieniu przez Autorkę uzyskanych wyników. Uzyskane przez doktorantkę wyniki badań parametrów biochemicznych gospodarki węglowodanowej i lipidowej oraz dane antropometryczne pacjentów leczonych z powodu ALL, sugerują istotny wpływ zmian metabolizmu sirtuiny 1 na pojawienie się następstw leczenia onkologicznego u dzieci w dalszym życiu w okresie remisji. Na podkreślenie zasługuje również fakt, iż badania przeprowadzono w ramach projektu Diamentowy Grant 0135/DIA/2016/45 finansowanego ze środków Ministerstwa Edukacji i Nauki. Podsumowując stwierdzam, że rozprawa doktorska lekarz Joanny Roguskiej 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 (tj. Dz.U. z 2017r poz 1789). W związku z tym mam zaszczyt przedstawić Radzie Dyscypliny Nauk Medycznych Wrocławskiego Uniwersytetu Medycznego wniosek o dopuszczenie lekarz Joanny Roguskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Prof. dr hab. Barbara Głowińska-Olszewska