

Poznań, 07 lipca 2021

Dr hab. n. med. Marta Fichna, prof. UMP

Katedra i Klinika Endokrynologii, Przemiany Materii

i Chorób Wewnętrznych

Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Ul. Przybyszewskiego 49, 60-355 Poznań

Tel. 61 869 1330

Recenzja

**rozprawy na stopień doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu lek. med. Joanny Roguskiej
p.t. „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 młodości”**

Praca doktorska wykonana w Katedrze i Zakładzie Podstaw Nauk Medycznych
Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu,
pod kierunkiem promotora **Pani dr hab. n. med. Ewy Barg**

Nowoczesne terapie onkologiczne, szczególnie protokoły stosowane w zakresie hematologii dziecięcej, umożliwiają efektywne leczenie i długotrwałe przeżycia coraz większej liczby pacjentów. Skuteczne terapie przeciwnowotworowe wiążą się jednak często z zastosowaniem leków o bardzo obciążającym wpływie na organizm, który może ujawniać się po wielu latach, będąc przyczyną odległych powikłań. Jednocześnie, narastająca wiedza z zakresu farmakogenetyki wskazuje, że reakcja na lek może w pewnej mierze zależeć od indywidualnego uposażenia genetycznego danej osoby. Współczesne terapie przeciwnowotworowe w coraz większym stopniu uwzględniają uwarunkowanie genetyczne dotyczące samego nowotworu, jaki i leczonego chorego, celem optymalnego doboru protokołów terapeutycznych. Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska lek. med. Joanny Roguskiej podejmuje tę ważną tematykę i stanowi cenną próbę oceny praktycznego zastosowania badań molekularnych w predykcji odległych powikłań leczenia ostrych białaczek wieku dziecięcego.



Podkreślić należy, iż badania przeprowadzono w ramach prestiżowego projektu Diamentowy Grant finansowanego ze środków Ministerstwa Edukacji i Nauki, a realizowany przez Doktorantkę projekt uzyskał zgodę Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym we Wrocławiu.

Dysertacja liczy 155 stron, stanowi zwartą monografię o typowym układzie, obejmującym wprowadzenie wraz z celami pracy, opis materiałów i metod, prezentację wyników badań oraz omówienie wyników wraz z dyskusją, zakończone wnioskami, po których następuje wykaz zastosowanych skrótów, streszczenie w języku polskim i angielskim, oraz spis piśmiennictwa. Wyniki badań są zaprezentowane w licznych tabelach, co ułatwia orientację w zebranych danych oraz ich interpretację. Piśmiennictwo liczy 178 pozycji, w większości opublikowanych w ostatnich latach w czasopiśmie o międzynarodowym zasięgu, ale uwzględnia również dokonania oraz rekomendacje polskich autorów (33 pozycje), a także uznane źródła internetowe. W pozycji 80. nie podano autorów, a w 129. – tytułu czasopisma.

Wprowadzenie do rozprawy liczy 18 stron i obejmuje 12 podrozdziałów. W pierwszym z nich opisana jest sirtuina 1, NAD-zależna deacetylaza histonowa, kodowana przez gen *SIRT1* i odgrywająca rolę w procesach starzenia, jak również zaangażowana w szlaki metaboliczne, regulację hormonalną oraz rozwój nowotworów. Następnie przedstawiony jest zespół metaboliczny wraz z jego komponentami. W odniesieniu do poszczególnych składowych zespołu metabolicznego omawiana jest prawdopodobna rola sirtuiny 1 oraz dotychczasowe dane na temat związku polimorfizmów genu *SIRT1* z zaburzeniami gospodarki węglowodanowej, lipidowej, nadciśnieniem tętniczym oraz nadmierną masą ciała. W opisie kryteriów rozpoznania zespołu metabolicznego warto byłoby powołać się na ich źródło, a także zwrócić uwagę na stężenia frakcji HDL cholesterolu, które najprawdopodobniej omyłkowo zostały podane odwrotnie dla kobiet i mężczyzn. Z kolei w prezentacji poszczególnych wariantów molekularnych genu *SIRT1* zdarzają się nieścisłości w zakresie użycia pojęć genotyp i allel, ale najprawdopodobniej są to błędy czysto edytorskie.

W drugiej części wstępu Doktorantka porządkuje wiedzę na temat ostrej białaczki limfoblastycznej, obowiązujących w różnych latach protokołów jej terapii oraz możliwych następstw leczenia tej choroby. Szczególnie starannie opisuje prawdopodobne mechanizmy molekularne modulującego wpływu sirtuiny 1 na działanie glikokortykosteroidów, które stosowane są na różnych etapach terapii białaczek, a także działania niepożądane L-asparaginazy, cytostatyku powodującego często hiperglikemię i dyslipidemię. Na zakończenie Autorka omawia potencjał terapeutyczny sirtuiny 1 oraz przedstawia substancje o działaniu modulującym jej stężenie, jak resveratrol, czy metformina. W kilku miejscach, np. przy prezentacji poznanych dotąd mechanizmów oddziaływania sirtuiny 1 na proces nowotworzenia (str. 15), czy przy wymienianiu późnych następstw leczenia białaczki (str. 21) dobrze byłoby podać bogatsze pozycje piśmiennictwa.

Wprowadzenie szeroko ujmuje temat doktoratu, w sposób który pozwala zrozumieć tematykę podjętych badań nawet osobom nie zorientowanym we wszystkich ich aspektach. Obszerny wstęp zakończony jest celami pracy, których realizację Doktorantka podzieliła na pięć jasno sformułowanych zadań badawczych. Zadanie 3. i 4., które obejmują badanie przedmiotowe i ocenę parametrów biochemicznych przynajmniej rok po zakończeniu leczenia białaczki można by połączyć w jeden punkt, jakkolwiek jest to uwaga czysto techniczna.

W części będącej opisem "Materiałów i metod", Doktorantka prezentuje dane dotyczące organizacji badania oraz charakteryzuje jego uczestników. Wśród informacji dotyczących grupy kontrolnej warto byłoby podać jej pochodzenie, a także czy grupa była dobrana względem płci i etapu dojrzewania. Następnie Doktorantka szczegółowo omawia metody zastosowanych oznaczeń biochemicznych wykonywanych w ramach badania oraz przeprowadzone analizy immunochemiczne oparte na komercyjnie dostępnych zestawach ELISA. W przypadku tych ostatnich, które posłużyły ocenie stężenia w surowicy insuliny, peptydu C i sirtuiny 1, zasada metody jest we wszystkich przypadkach ta sama, natomiast istotne byłoby uzupełnienie danych na temat czułości i swoistości zastosowanych zestawów, a także ich współczynników zmienności wewnątrz- oraz międzytestowej. W dalszej części na uwagę zasługuje bardzo precyzyjny i czytelny opis procedury pobrania krwi od uczestników badania wraz z wykonaniem doustnego testu tolerancji glukozy (ang. *Oral Glucose Tolerance Test*, OGTT). W części dotyczącej PCR nie podano sekwencji starterów, ani długości amplifikowanych fragmentów, co jest konieczne, aby umożliwić ewentualne badania replikacyjne, a przede wszystkim stanowi dobrą praktykę opisu analiz molekularnych, potwierdzającą specyficzność zastosowanych primerów oraz amplifikację właściwego odcinka DNA. Również metoda minisekwencjonowania (SNaPshot) mogłaby być bardziej precyzyjnie opisana, aby umożliwić zrozumienie jej zasady osobom, które nie miały dotąd do czynienia z tą techniką. W końcowym fragmencie opisu „Materiałów i metod” Doktorantka wyczerpująco prezentuje analizy statystyczne zastosowane w opracowywaniu wyników badania.

Rozbudowane wyniki badań obejmują 66 stron (str. 38-103) rozprawy i są przede wszystkim zaprezentowane w formie tabelarycznej opatrzonej krótkimi komentarzami dotyczącymi wyników znamienych statystycznie. Po krótkiej charakterystyce grupy badanej, w tabeli 2 Doktorantka przedstawia szerokie porównanie grupy badanej i kontrolnej. Obok istotnych statystycznie różnic w stężeniach sirtuiny 1 (30,9 ng/ml vs. 18,0 ng/ml), glikemii w 120. minucie OGTT, oraz niektórych parametrów gospodarki lipidowej, zwraca uwagę różna proporcja osób płci żeńskiej i męskiej w obu grupach (37% kobiet w grupie badanej i 54% kobiet wśród kontroli). Różnica ta jest tuż poniżej granicy istotności statystycznej ($p=0,041$), jednak gdyby nie fakt, że w obu grupach mamy do czynienia z osobami o medianie wieku 13 lat, a więc dopiero na wczesnych etapach dojrzewania płciowego, mogłaby rzeczywiście mieć znaczący wpływ na uzyskane wyniki kolejnych analiz, zwłaszcza metaboliczno-biochemicznych. W dalszym toku analiz Doktorantka ocenia korelacje stężeń

sirtuiny 1 z parametrami gospodarki węglowodanowej i lipidowej w obu grupach uczestników badania, a także bada ich korelacje z danymi antropometrycznymi. W grupie badanej istotnie statystycznie dodatnie korelacje stwierdzono pomiędzy stężeniem trójglicerydów wyrażonym jako procent normy a stężeniem glukozy na czczo, stężeniem glukozy w 120. min OGGT, stężeniem insuliny na czczo, stężeniem insuliny w 120. min OGTT we krwi, natomiast ujemne istotne statystycznie korelacje wykazano pomiędzy stężeniem cholesterolu HDL wyrażonym jako procent normy a glukozą w 60. min OGGT, glukozą w 120. min OGTT, insuliną na czczo, insuliną w 60 min OGTT, insuliną w 120 min OGTT oraz wskaźnikiem HOMA-IR. Następnie Doktorantka dokonuje systematycznych porównań badanych parametrów w obrębie dwóch grup, z ich podziałem pod względem glikemii na czczo i w przebiegu OGTT, insulinemii na czczo, wartości wskaźnika HOMA-IR, stężeń CRP oraz frakcji cholesterolu. Jest to bardzo ciekawa część analiz, jakkolwiek z uwagi na tworzenie kolejnych podgrup, w niektórych z nich występują bardzo małe liczebności – po dwie do sześciu osób (Tabela 5a i b, Tabela 6, Tabela 8), co utrudnia pełnowartościowe porównania statystyczne. W dalszej części porównania i korelacje stężeń sirtuiny 1 i parametrów metabolicznych są analizowane z uwzględnieniem płci uczestników badania oraz wartości skurczowego i rozkurczowego ciśnienia tętniczego krwi. Część z przedstawionych analiz wykazała interesujące zależności, m.in. wyższe stężenie sirtuiny 1 u osób z grupy badanej z prawidłowymi wartościami skurczowego i rozkurczowego ciśnienia tętniczego, aniżeli u osób grupy kontrolnej z prawidłowym ciśnieniem tętniczym. Mnogość przeprowadzonych testów dowodzi biegłości Doktorantki w zakresie właściwego doboru i posługiwania się narzędziami statystycznymi. Natomiast na etapie publikacji wyników, które z pewnością na to zasługują, sugerowałabym ograniczenie prezentowanych analiz do ściśle logicznie powiązanej serii, z możliwie najmniejszymi podziałami na podgrupy.

Szczególnie interesujący z klinicznego punktu widzenia jest podrozdział wyników, w którym przeanalizowany został stan kliniczny pacjentów ze względu na zastosowany u nich starszy lub nowszy schemat leczenia ostrej białaczki limfoblastycznej. Dla pacjentów leczonych wg nowszego algorytmu z 2009r wykazano istotnie niższe stężenia glukozy i insuliny w OGTT, mniejszą wartość wskaźnika HOMA-IR, stężenie HbA1c oraz trójglicerydów, a wyższy wskaźnik insulinowrażliwości QUICKI. Ponadto stwierdzono istotnie wyższe stężenie sirtuiny 1 w surowicy uczestników, u których nie doszło do wznowy białaczki, w porównaniu z tymi, którzy doświadczyli nawrotu choroby.

Ostatnia część opisu wyników obejmuje ocenę częstości występowania polimorfizmów genu *SIRT1*, ich związku z parametrami gospodarki węglowodanowej, lipidowej oraz danymi antropometrycznymi w grupie badanej i kontrolnej. Podrozdział otwiera krótkie uzasadnienie selekcji sześciu badanych wariantów molekularnych genu *SIRT1*. Ten klarowny fragment bardzo dobrze pasowałby do opisu metod, ponieważ umożliwiłby od razu zrozumienie podstaw wyboru badanych w ramach doktoratu polimorfizmów. Następnie Doktorantka kolejno prezentuje elektroforegramy, tabele z częstościami

występowania poszczególnych genotypów w grupie badanej i kontrolnej oraz porównanie parametrów gospodarki węglowodanowej, lipidowej oraz danych antropometrycznych u nosicieli poszczególnych genotypów z każdej z grup. Dla niektórych badanych wariantów (rs2273773, rs10509291, rs7895833) stwierdzono obecność jedynie dwóch genotypów, homozygoty typu dzikiego i heterozygoty. Z kolei w przypadkach, gdy homozygota typu rzadkiego została wykryta jedynie u kilku badanych osób (rs12778366, rs10823130, rs932658), uzasadnione jest przeprowadzenie analiz np. w modelu dominującym, poprzez porównanie wartości danego parametru u homozygot typu dzikiego z połączoną kohortą nosicieli allelu rzadkiego (heterozygot i homozygot). Pozwala to zwiększyć liczebności, a tym samym moc badania.

Porównując parametry biochemiczne wyższe stężenia sirtuiny 1 wykazano dla nosicieli genotypów TT rs2273773, TT i TC rs12778366, TT rs10509291, oraz AA i AG rs7895833 w grupie badanej w porównaniu do grupy kontrolnej. Stężenie triglicerydów wyrażone jako procent normy było istotnie wyższe u nosicieli genotypów TT rs2273773, TC rs12778366, TT rs10509291, AG rs1082313 oraz AG rs7895833 w grupie badanej w porównaniu do grupy kontrolnej. Ponadto wyrażone procentowo stężenie cholesterolu LDL okazało się statystycznie wyższe u osób z genotypem TT rs10509291 oraz AA rs7895833 w grupie badanej w porównaniu ze zdrowymi kontrolami. Dla wariantów rs932658 nie wykazano znaczących statystycznie różnic parametrów biochemicznych. Ponieważ badane polimorfizmy znajdują się w obrębie jednego locus, stosunkowo blisko siebie, mogą pozostawać w tzw. nierównowadze sprzężeń, czyli dziedziczyć się wspólnie. W takiej sytuacji trudno jednoznacznie określić, czy wykazany statystycznie związek danego polimorfizmu z ocenianą cechą kliniczną jest przyczynowy, czy stanowi jedynie obserwację wtórną do lokalizacji w bliskim sąsiedztwie polimorfizmu o rzeczywistym znaczeniu dla danej cechy. Dodatkowo niektóre polimorfizmy mogą mieć wpływ nasilający, a inne – osłabiający daną cechę, np. poprzez przeciwstawny efekt na ekspresję genu. Rozdzielenie wpływów sprzężonych polimorfizmów jest często niemożliwe, dlatego w takich przypadkach ucieka się do analizy całych ich układów, czyli haplotypów. Tego typu badanie mogłoby doskonale uzupełniać zaprezentowane w rozprawie wyniki i być może warto umieścić je w planowanym artykule do publikacji.

Uzyskane wyniki są następnie szeroko omawiane w dyskusji do rozprawy. Doktorantka odwołuje się do wcześniej publikowanych danych doświadczalnych i klinicznych dotyczących roli sirtuiny 1 w metabolizmie węglowodanów, lipidów oraz jej potencjalnego znaczenia przeciwnowotworowego. Starannie przedstawia skomplikowane molekularne aspekty związków sirtuiny 1 z regulacją glukoneogenezy, glikolizy, czynności komórek beta wysp trzustkowych, czy procesów naprawy DNA. Umiejętnie konfrontuje wyniki własnych badań z dotychczasową wiedzą, a w przypadkach stwierdzanych sprzeczności proponuje kreatywne wyjaśnienia obserwowanych różnic. W oparciu o dane literaturowe oraz obserwacje własne przekonująco dowodzi, że pacjenci po leczeniu ostrej

białaczki limfoblastycznej są narażeni na zwiększone ryzyko rozwoju składowych zespołu metabolicznego. Opisuje też współzależności pomiędzy parametrami wchodzącymi w skład zespołu metabolicznego a sirtuiną 1, sugerując iż ta ostatnia może być elementem mechanizmów kompensacyjnych pozwalających utrzymać kontrolę np. ciśnienia tętniczego krwi pomimo obciążeń wynikających z terapii białaczki. Celnie zauważa, że postaci ostrej białaczki limfoblastycznej o wysokim ryzyku, wiążą się z koniecznością bardziej radykalnych działań terapeutycznych, które w większym stopniu zaburzają czynności metaboliczne i rozwój młodego organizmu, częściej przyczyniając się do odległych powikłań. Na podstawie wyników własnych analiz potwierdza, że nowsze, udoskonalone schematy terapeutyczne, wiążą się z korzystniejszymi parametrami metabolicznymi, ocenianymi po zakończeniu leczenia. Kolejno omawia też wyniki parametrów biochemicznych uzyskane z uwzględnieniem polimorfizmów genu sirtuiny 1, *SIRT1*. Część genotypów wiąże się z wyższymi stężeniami sirtuiny 1 we krwi, podwyższonymi wartościami triglicydemii, czy cholesterolu frakcji LDL. Wyniki te w większości pozostają w zgodzie z wcześniejszymi doniesieniami dotyczącymi innych grup badanych, natomiast w przypadku kontrowersji, jak np. w odniesieniu do związku rs7895833, Doktorantka bardzo rozważnie omawia zaobserwowane różnice, szeroko powołując się na źródła literaturowe i poszukując przyczyn, np. w odmiennościach populacyjnych. Na zakończenie Doktorantka formułuje sześć trafnych wniosków, które odpowiadają wynikom przeprowadzonych analiz i dowodzą konsekwentnej realizacji zaplanowanych celów projektu badawczego. Przeprowadzone badania prezentują nową, oryginalną wartość kliniczną i dają mocną podstawę dla dalszych projektów skupionych na odległych metabolicznych konsekwencjach leczenia przeciwnowotworowego, które stanowią coraz istotniejsze zagadnienie współczesnej onkologii.

Powyższe uwagi i rozważanie w żaden sposób nie umniejszają wartości przedstawionej do recenzji pracy. Z przekonaniem stwierdzam, że rozprawa lek. med. Joanny Roguskiej zatytułowana „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” spełnia wymogi zawarte w art. 13 ust. 1 Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki. Wnioskuje do Rady Dyscypliny Nauki Medyczne Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu o dopuszczenie Pani Joanny Roguskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Poznań, 07 lipca 2021



dr hab. n. med. Marta Fichna