



**INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ**

**im. Ludwika Hirszfelda**

**Polskiej Akademii Nauk**

**ul. Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław**

**tel. (4871) 337 1172, (4871) 370 9930, fax: (4871) 337 2171**

**<https://hirszfeld.pl>**

Wrocław, 23.09.2021

**Ocena rozprawy doktorskiej lek. Agnieszki Szeremet zatytułowanej:  
„Ocena przydatności wybranych mikroRNA w monitorowaniu wczesnej  
toksyczności związanej z mega-chemioterapią stosowaną przed autologiczną  
transplantacją komórek hematopoetycznych u pacjentów z rozrostami B-  
komórkowymi”**

Promotor pracy: prof. dr hab. n. med. Tomasz Wróbel  
Katedra i Klinika Hematologii, Nowotworów Krwi i Transplantacji Szpiku  
Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu

1. Ocena merytoryczna

1.1 Trafność podjętej tematyki badawczej i jej oryginalność

Autoprzeszczepienie komórek krwiotwórczych poprzedzone wysokodawkowaną chemioterapią jest uznaną metodą leczenia chorób nowotworowych układu krwiotwórczego. Metoda ta jest także stosowana w leczeniu nowotworów litych, jak również w niektórych przypadkach schorzeń autoimmunologicznych. Procedura przeszczepienia autologicznych komórek krwiotwórczych rozpoczyna się od wysokodawkowej chemioterapii (leczenia kondycjonującego) przed przeszczepem. Efekt terapeutyczny (przeciwnowotworowy) zależy jednak od odpowiedzi na leczenie wysokodawkowe, które z jednej strony zabija komórki nowotworowe, z drugiej zaś niesie ze sobą nasilone ryzyko powikłań toksycznych. Dlatego też poszukuje się odpowiedniego czynnika prognostycznego (biomarkera) pozwalającego na oszacowanie tego ryzyka i przewidywanie niekorzystnych dla pacjenta skutków ubocznych zastosowanych procedur leczniczych, w tym wysokodawkowanej chemioterapii wspomaganą transplantacją autologicznych komórek krwiotwórczych. Temu zagadnieniu jest poświęcona

recenzowana praca. Jej przedmiotem jest analiza wybranych cząsteczek mikroRNA w dwóch grupach pacjentów: chorych z nowotworami układu chłonnego z limfocytów B oraz chorych na szpiczaka plazmocytozy. Badaniem objęto łącznie 80 pacjentów, po 40 przypadków w każdej z analizowanych grup, oraz 25 zdrowych ochotników, u których nie stwierdzono chorób nowotworowych ani poważnych chorób współistniejących.

Doktorantka i Jej Promotor znakomicie włączyli się w badania nad poszukiwaniem czynników prognostycznych zastosowanego postępowania terapeutycznego. Ich znaczenie jest o tyle istotne, iż istnieje możliwość przeniesienia uzyskanych wyników bezpośrednio do praktyki klinicznej i wykorzystania stosunkowo prostej analizy ekspresji krążącego we krwi mikroRNA do oceny ryzyka niepowodzeń zastosowanej terapii. W tym świetle podjęcie tematu „Ocena przydatności wybranych mikroRNA w monitorowaniu wczesnej toksyczności związanej z mega-chemioterapią stosowaną przed autologiczną transplantacją komórek hematopoetycznych u pacjentów z rozrostami B-komórkowymi” uważam za szczególnie zasadne.

## 1.2 Ocena uzyskanych rezultatów i ich znaczenie dla nauki i praktyki

Prezentację wyników pracy rozpoczęto od omówienia skutków wysokodawkowanej chemioterapii w analizowanych grupach chorych, a następnie przedstawiono kolejno wyniki analiz wyjściowego stopnia ekspresji wybranych mikroRNA, ekspresji mikroRNA analizowane w odniesieniu do wystąpienia powikłań toksycznych oraz korelacji między ekspresją mikroRNA i innymi parametrami klinicznymi.

W obu grupach pacjentów najczęstszym powikłaniem były infekcje. Wśród analizowanych cząsteczek mikroRNA (miR) na uwagę zasługuje miR-122, choć jego ekspresja u pacjentów nie różniła się istotnie od tej obserwowanej u osób zdrowych. Jak wykazano, miR-122 może stanowić czynnik predykcyjny. Stwierdzono bowiem, iż miR-122 wykazuje wysoką ekspresję przed włączeniem mega-chemioterapii u chorych, u których częściej wystąpiły powikłania infekcyjne. Zależność ta szczególnie widoczna jest u chorych ze szpiczakiem plazmocytozy. Ponadto nasilenie ekspresji miR-122 wykazuje związek z laboratoryjnymi cechami uszkodzenia wątroby (np. wyjściową ekspresją transaminaz). Z kolei wyższa ekspresja miR-201 charakteryzowała chorych bez powikłań infekcyjnych.

Stwierdzono korelację między ekspresją miR-150 a liczbą leukocytów przed rozpoczęciem kondycjonowania (w całej grupie chorych oraz u pacjentów ze szpiczakiem) oraz związek ekspresji miR-150, miR-155 oraz miR-210 z chorobami współistniejącymi ocenianymi wskaźnikiem chorób współistniejących przy przeszczepieniu krwiotwórczych komórek macierzystych (ang. *hematopoietic stem cell transplantation comorbidity index*; HCT-CI).

Uzyskane nowatorskie wyniki badań nad poszukiwaniem czynników prognostycznych (biomarkerów) powodzenia stosowanej terapii mają niezwykle znaczenie dla poddanego leczeniu pacjenta i jego lekarza prowadzącego.

Ciekawym byłaby dodatkowa analiza bioinformatyczna mająca na celu zidentyfikowanie istotnych z klinicznego punktu widzenia białek, których ekspresja jest potencjalnie regulowana przez miR-122 jak również miR-150, miR-155 czy miR-210. Może efektem byłoby opracowanie nowych schematów leczenia?

### 1.3 Poprawność formalno – językowa, stylistyczna i interpunkcyjna

Poprawność formalno – językowa, stylistyczna i interpunkcyjna pracy nie budzi zastrzeżeń, choć Autorka nie uniknęła drobnych błędów językowych (błędów literowych czy np. użycia niefortunnego sformułowania „mieszanka reakcyjna”) czy redakcyjnych. Ich obecność jednak nie umniejsza w istotny sposób wartości pracy.

## 2. Ocena metodologiczna

### 2.1 Dobór literatury, umiejętności wykorzystania źródeł

Autorka bardzo sprawnie porusza się w tematyce badawczej, cytując zarówno prace źródłowe, dla podkreślenia znaczenia nieco starszych odkryć, jak również dobrze wykorzystuje najnowsze dane literaturowe. W sumie cytowanych jest 66 dobrze wyselekcjonowanych pozycji piśmienniczych.

### 2.2 Poprawność formułowania problemów i hipotez (założenia badawcze)

Doktorantka dobrze określiła przedmiot badań, jakim jest analiza porównanie ekspresji mikroRNA u pacjentów z rozrostami B komórkowymi poddanych wysokodawkowanej chemioterapii wspomaganej autologiczną transplantacją komórek hematopoetycznych w odniesieniu do ryzyka wystąpienia powikłań toksycznych i innych wybranych parametrów, np. biochemicznych. Oceeniła stopień ekspresji hsa-miR-122-5p, hsa-miR-146a-5p, hsa-miR-150-3p, hsa-miR-155-3p, hsa-miR-201-5p oraz hsa-miR-423-5p. Nie sprecyzowała jednak, co skłoniło ją do wybrania i analizy akurat tych 6 wymienionych cząsteczek mikroRNA. Dlaczego, na przykład, nie rozpoczęto analiz od screeningu większej liczby cząsteczek mikroRNA?

Doktorantka zdefiniowała cztery cele pracy: (i) analiza toksyczności mega-chemioterapii wspomaganej autologiczną transplantacją komórek hematopoetycznych w badanych grupach chorych, (ii) określenie wartości predykcyjnej wybranych mikroRNA w przewidywaniu

toksyczności infekcyjnej i narządowej, (iii) poszukiwanie zależności między ekspresją mikroRNA a wybranymi wskaźnikami upośledzenia czynności narządów oraz (iv) ocena korelacji ekspresji mikroRNA z wartością wybranych wskaźników chorób współistniejących. Cele te konsekwentnie realizowała, opisując wyniki przeprowadzonych analiz oraz płynące z nich wnioski.

Dyskusja pracy zakończona jest stwierdzeniem, iż otrzymane wyniki stanowią „atrakcyjny punkt wyjścia do dalszych badań”. W związku z tym nasuwa pytanie: Jakiego typu dalsze badania byłyby zdaniem Doktorantki warte przeprowadzenia i co wartościowego mogłyby wniesić ich wyniki?

### 2.3 Trafność doboru metod i narzędzi badawczych, umiejętności ich zastosowania

Badaniem objęto w sumie 125 osób, w tym dwie dobrze scharakteryzowane pod względem klinicznym grypy pacjentów, 40 chorych z nowotworami układu chłonnego z limfocytów B i 40 chorych na szpiczaka plazmacytowego, oraz 25 osób stanowiących grupę kontrolną.

Badania prowadzono z wykorzystaniem zaawansowanych technik biologii molekularnej i odpowiednich narzędzi statystycznych. Ekspresję wybranych mikroRNA analizowano z użyciem odwrotnej transkrypcji (ang. *reverse transcription quantitative polymerase chain reaction*; RT-qPCR) oraz nowatorskiej technologii emulsyjnego PCR (ang. *droplet digital PCR*; ddPCR) do ilościowego oznaczania mikroRNA.

W podrozdziale 3.4. Pobranie materiału Doktorantka nie tylko opisała punkty czasowe, w których pobierane były próbki do badań ekspresji 6 wybranych cząsteczek mikroRNA, ale podała również, iż w tych samych punktach czasowych badano morfologię, stężenie kreatyniny, BNP, troponiny I, CRP, aktywność AST i ALT oraz frakcje mioglobliny kinazy kreatynowej. Niestety ani w rozdziale Materiały i Metody, ani w innych częściach rozprawy nie znalazłam informacji na jakiej podstawie wybrano cząsteczki mikroRNA, których stopień ekspresji analizowano.

### 2.4 Poprawność układu pracy i struktury podziału treści

Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska ma odpowiedni dla tego typu opracowań układ obejmujący, po wykazie użytych skrótów, następujące rozdziały: Wprowadzenie, Cele pracy, Materiały i metody, Wyniki, Omówienie wyników i dyskusja, Wnioski oraz Streszczenie w języku polskim i w języku angielskim, Biografię jak również wykaz tabel i wykaz rycin.

W 12-stronnicowym Wprowadzeniu Autorka opisała zasady poprzedzonej wysokodawkowaną chemioterapią autologiczną transplantacji komórek mobilizowanych ze szpiku do krwi obwodowej (ang. *autologous peripheral blood stem cell transplantation*, autoPBSCT),

przedstawiła klasyfikacje nowotworów układu chłonnego wywodzących się z limfocytów B oraz czynniki prognostyczne, a następnie wskazania do wysokodawkowanej chemioterapii u chorych na chłoniaki i szpiczaka plazmocytowego poddawanych autoPBSCT. W dwóch kolejnych podrozdziałach skupiła się na ocenie występowania chorób współistniejących oraz rodzajach toksyczności związanej z wysokodawkowaną chemioterapią poprzedzającą autoPBSCT. Wprowadzenie kończy się krótką charakterystyką oraz opisem znaczenia funkcjonalnego/klinicznego mikroRNA, będącego przedmiotem badań niniejszej pracy.

W kolejnym rozdziale przedstawiła cele pracy. Następnie, w rozdziale Materiały i metody scharakteryzowała analizowane grupy pacjentów i osób zdrowych, podając opis metod wykorzystywanych do przeprowadzenia badań ekspresji mikroRNA i statystycznej analizy wyników.

Opatrzony 14 tabelami i 5 rycinami rozdział Wyniki składa się z pięciu podrozdziałów. (Uwaga: ani rycinach, ani w opisie pod rysunkami nie podano wartości p (choć były istotne statystycznie)). W pierwszym i drugim omówiono, odpowiednio, skutki wysokodawkowanej chemioterapii BEAM u chorych na chłoniaki oraz toksyczność wysokodawkowanego melfalanu u chorych na szpiczaka poddanych autotransplantacji. Trzeci podrozdział poświęcono prezentacji wyników analizy wyjściowego stopnia ekspresji wybranych mikroRNA. I tutaj kolejny raz nasuwa się pytanie na jakiej podstawie dokonano wyboru cząsteczek do analizy? W czwartym podrozdziale opisano wyniki ekspresji mikroRNA analizowane w odniesieniu do wystąpienia powikłań toksycznych, natomiast w piątym – wyniki analiz korelacji między ekspresją mikroRNA a liczbą leukocytów i parametrami biochemicznymi.

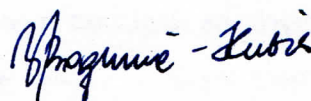
Po rozdziale Omówienie wyników i dyskusja Autorka zamieściła Wnioski oraz streszczenia pracy w języku polskim i angielskim. W opisie metodologii podanej w streszczeniach pojawiły się pewne nieścisłości w odniesieniu do informacji zamieszczonych w rozdziale Materiały i metody dotyczące próbek, do których pobierano krew do dalszych badań. W podrozdziale 3.4. Pobranie materiału podano informację, iż były to „próbki dedykowane do oznaczania mikroRNA PAX Gene (Qiagen, Hilden, Niemcy)” natomiast w streszczeniu znajduje się informacja, iż były to „próbki RNAlater solution (Qiagen, Hilden, Germany)”.

Wniosek końcowy (konkluzja)

Przedłożoną mi do recenzji rozprawę doktorską oceniam wysoko. Przygotowując ją lek. Agnieszka Szeremet wykazała się szeroką wiedzą teoretyczną, umiejętnością pracy koncepcyjnej oraz krytycznej analizy i interpretacji wyników badań laboratoryjnych w odniesieniu do danych klinicznych, jak również umiejętnością prezentacji, opisu i dyskusji otrzymanych wyników.

Rozprawa doktorska lek. Agnieszki Szeremet pt. „Ocena przydatności wybranych mikroRNA w monitorowaniu wczesnej toksyczności związanej z mega-chemioterapią stosowaną przed autologiczną transplantacją komórek hematopoetycznych u pacjentów z rozrostami B-komórkowymi” 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 (Dz. U. Nr 65, poz. 595, z późn. zm.).

Wniosuję zatem do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauki Medyczne Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu o dopuszczenie lek. Agnieszki Szeremet do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



prof. dr hab. Katarzyna Bogunia-Kubik