

Warszawa, 02.05.2023

Ocena

rozprawy doktorskiej lekarz **Klaudii Cieśluk pt. „Ocena profilu metabolicznego u chorych na dyskrazje plazmocytowe”** wykonanej pod kierunkiem Pana dr hab. n. med. Jarosława Piszczka w Klinice Hematologii i Chorób Naczyń Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku.

Dyskrazje komórek plazmatycznych to heterogenna grupa zaburzeń spowodowanych monoklonalną proliferacją komórek plazmatycznych oraz zdolnością tych komórek do produkcji białka monoklonalnego. Obecność białka monoklonalnego (białka M) można potwierdzić badaniem immunofiksacji białek w surowicy i/lub w moczu. Przebieg kliniczny dyskrazji plazmocytowych jest zróżnicowany. W tej grupie chorób obserwowane są zarówno choroby rozwijające się powolnie, indolentne, niewywołujące objawów i nie wymagające leczenia przeciwnowotworowego oraz choroby, których agresywność przebiegu wywołuje upośledzenie funkcji narządów, może zagrażać życiu oraz wymaga natychmiastowego leczenia.

Podział dyskrazji plazmocytowych wg WHO 2016:

- Szpiczak plazmocytowy (bezobjawowy, tłący/niewydzielający/białaczka plazmocytoza)
- Gammapatia monoklonalna o nieustalonym znaczeniu (MGUS), IgG/IgA
- Plazmocytoza (pojedynczy guz plazmocytowy kości/pozakostny)
- Choroby z odkładania immunoglobulin (pierwotna amyloidoza/choroba łańcuchów lekkich/choroba łańcuchów ciężkich)
- Szpiczak osteosklerotyczny (tzw. zespół POEMS, ang. polyneuropathy, organomegaly, endocrinopathy, monoclonal gammopathy, skin changes syndrome) (polineuropatia, organomegalia, zaburzenia endokrynologiczne, gammapatia monoklonalna, zmiany skórne)

Najpoważniejszą i najbardziej rozpowszechnioną dyskracją komórek plazmatycznych jest szpiczak plazmocytowy z medianą wieku zachorowania wynoszącą 70 lat. Szpiczak plazmocytowy (ang. multiple myeloma, MM) według dostępnych danych wystandaryzowany w stosunku do wieku wskaźnik zapadalności na MM (ang. age-standardized incidence rate, ASIR) na świecie w 2019 roku wynosił 1,92/100 000 osób. W latach 1990 – 2016 liczba chorych na MM wzrosła o 126%, a sama choroba stanowiła do 2% wszystkich przypadków zachorowań na nowotwory złośliwe i 10% nowotworów hematologicznych. W Polsce rocznie obserwowanych jest ponad 2000 nowych zachorowań, co czyni chorobę jednym z trzech najczęściej występujących nowotworów hematologicznych.

Pierwsze udokumentowane informacje nt. szpiczaka plazmocytozowego pochodzą z opisanego w 1844 przez Samuela Solly'ego przypadku klinicznego 39-letniej kobiety z patologicznymi złamaniami kości. Termin „szpiczak mnogi” został zaproponowany przez Osipa Rustickiego w 1873 roku. Kolejny przypadek pacjenta z bólami kostnymi oraz charakterystycznymi zmianami w badaniach laboratoryjnych (niedokrwistość, albuminuria, nietypowe białko w badaniu ogólnym moczu) u 46-letniego mężczyzny opisał w 1889 roku Otto Kahler, a choroba zyskała drugą nazwę - choroba Kahlera.

Etiologia szpiczaka plazmocytozowego nie została do końca poznana. U podłoża choroby leży klonalny rozrost komórek plazmatycznych w szpiku kostnym, czyli komórek wywodzących się z dojrzałych limfocytów B. Komórki te proliferują w sposób niekontrolowany w szpiku kostnym oraz pozaszpikowo w innych narządach produkując klonalne immunoglobuliny. Proces powstawania nowotworowo zmienionej komórki plazmatycznej związany jest między innymi z wystąpieniem mutacji w obrębie genu łańcucha ciężkiego immunoglobulin, które w konsekwencji prowadzą do wytworzenia klonu plazmocytozów niepodlegających apoptozie.

Szpiczak plazmocytozowy jest heterogennym biologicznie i klinicznie nowotworem. Obserwowane są postaci bezobjawowe, skąpo-wydzielające (oligosekrecyjne) lub nieprodukujące białka monoklonalnego, zlokalizowane w szpiku kostnym i poza nim, czy też białaczkowe formy choroby. Każda z postaci MM może być wyjściem do kolejnego stopnia zaawansowania procesu nowotworowego.

Częstość występowania MM rośnie wraz z wiekiem – w 90% przypadków choroba dotyczy osób powyżej 50. roku życia, w tym 40% to osoby powyżej 80. roku życia. Przed 40. rokiem życia diagnozowanych jest około 2% pacjentów, poniżej 30. roku życia – zaledwie 0,3%. Nie stwierdzono przypadków szpiczaka plazmocytozowego wśród dzieci.

Poza wiekiem, do czynników ryzyka wystąpienia choroby zaliczyć można płeć oraz rasę. Choroba nieco częściej obserwowana jest u mężczyzn niż kobiet (M/K = 1,21) oraz dwukrotnie częściej u Afroamerykanów w stosunku do osób rasy białej. Mimo, że choroba nie jest uznawana za chorobę genetyczną, zdarzają się przypadki rodzinnego występowania MGUS czy MM. Występowanie w najbliższej rodzinie chorób nowotworowych, przede wszystkim limfoproliferacyjnych, zwiększa ryzyko zachorowania na MM.

W badaniach dotyczących epidemiologii szpiczaka plazmocytozowego zaobserwowano również związek z otyłością, która zwiększa ryzyko wystąpienia choroby. Podwyższone ryzyko względne odnotowywano niezależnie od wykorzystywanego wskaźnika otyłości (BMI, obwód talii, obwód bioder). Wpływ otyłości na rozwój szpiczaka plazmocytozowego nie został w pełni wyjaśniony. Uważa się, że może mieć to związek z produkowaną przez adipocyty interleukiną 6, która posiada udowodnione działanie antyapoptotyczne i wpływ na możliwości proliferacji komórek szpiczakowych. Nie udowodniono wpływu narażenia na promieniowanie i substancje chemiczne na ryzyko rozwoju MM czy MGUS.

Metabolomika to względnie nowa i wzbudzająca coraz większe zainteresowanie naukowców dziedzina biologii systemowej, tak zwanej systeomiki. Zajmuje się kompleksowym badaniem interakcji zachodzących w układach biologicznych od poziomu pojedynczej komórki po całe gatunki.

Metabolomika ma na celu scharakteryzować metabolom, czyli kompletny zbiór metabolitów lub drobnocząsteczkowych substancji chemicznych (<1-1,5 kDa) biorących udział w procesach biologicznych zachodzących w komórce, tkance, narządzie czy całym organizmie (węglowodany, kwasy tłuszczowe, aminokwasy, nukleotydy, barwniki, witaminy i wiele innych).

Dwa główne podejścia w badaniu metabolomu to analiza celowana oraz niecelowana. Wariant celowany, zwany profilowaniem metabolicznym, skupia się na ilościowym lub półilościowym pomiarze konkretnej, dobrze scharakteryzowanej pod względem właściwości fizykochemicznych grupy metabolitów biorących udział w danym procesie biologicznym i badaniu zależności pomiędzy poziomami wszystkich metabolitów, które tworzą dany

profil metaboliczny. W przypadku tego wariantu stosuje się techniki analityczne mające na celu zapewnienie maksymalnej czułości i selektywności. Analiza niecelowana, tak zwany metaboliczny odcisk palca (ang. metabolic fingerprinting), zajmuje się jakościowym oznaczeniem wszystkich drobnocząsteczkowych związków znajdujących się w analizowanej próbce, zarówno dobrze poznanych związków, jak i dotychczas niescharakteryzowanych, co czyni to podejście szczególnie istotnym przy identyfikacji nowych metabolitów. Podejście to wykorzystuje techniki analityczne, które zapewniają mniej złożone i bardziej odtwarzalne dane. Wariant niecelowany pozwala również wytypować potencjalnie istotne pod kątem przyjętej hipotezy badawczej metabolity, które mogą następnie zostać szczegółowo ocenione przy zastosowaniu metabolomiki celowanej.

Charakterystyczną cechą każdego metabolomu jest jego dynamizm i zależność od wielu zmiennych zewnętrznych i wewnętrznych, takich jak wiek, płeć, środowisko, dieta, pora dnia czy własna genetyka.

Metabolomika zapewnia wgląd w aktualny stan zdrowia organizmu, a same metabolity są jego końcową odpowiedzią na zachodzące w nim zmiany.

Nauka w w/w zakresie jest uważana za cenne narzędzie mogące posłużyć do odkrywania specyficznych biomarkerów chorób i rozwoju medycyny personalizowanej.

Zastosowanie metabolomiki badane jest zarówno w onkologii w celu określenia przydatności metody do wcześniejszego diagnozowania nowotworów, selekcji pacjentów do badań klinicznych, określania biomarkerów odpowiedzi na leczenie. W hematologii min. do identyfikacji potencjalnych markerów transformacji nowotworowej oraz agresywnego przebiegu choroby, które mogłyby odgrywać rolę przy kwalifikacji pacjentów do wcześniejszego rozpoczęcia leczenia.

Identyfikacja potencjalnych biomarkerów w hematoonkologii odbywa się najczęściej poprzez porównywanie osób zdrowych i pacjentów ze zdiagnozowaną chorobą nowotworową (biomarkery transformacji nowotworowej), przez porównanie chorych przed i po rozpoczęciu leczenia przeciwnowotworowego (biomarkery oporności na leczenie) lub próbek pobranych retrospektywnie i podczas postępu choroby nowotworowej (biomarkery progresji).

Celem analizy naukowej lek. Klaudii Cieśluk było określenie profili metabolicznych pacjentów z wybranymi dyskracjami plazmocytowymi: MGUS oraz szpiczakiem plazmocytowym.

Dodatkowym celem była identyfikacja potencjalnych biomarkerów progresji MGUS do MM.

Hipoteza badawcza zakłada możliwość wytypowania potencjalnie istotnych biomarkerów pod kątem wpływu na progresję i rokowanie MM.

Podstawą rozważań naukowych doktorantki stała się stale uaktualniana przez badaczy wiedza na temat roli diagnostycznej i predycyjnej zidentyfikowanych biomarkerów metabolizmu w guzach litych oraz nowotworach hematologicznych.

Doktorantka przedstawiła w dysertacji wyniki analiz innych autorów. Park i wsp. w 2019r analizowali metabolomikę u chorych z nowotworem piersi. Zidentyfikowali cztery potencjalne biomarkery (L-oktanoilokarnitynę, 5-oksoprolinę, hipoksantynę i kwas dokozaheksaenowy), z których L-oktanoilokarnityna wykazała najwyższą wartość diagnostyczną, ze 100% dodatnią wartością predykcyjną. Jej poziom różnił się w zależności od wielkości guza i ekspresji receptorów hormonalnych. Zidentyfikowane w tym badaniu metabolity zostały uznane za potencjalne biomarkery umożliwiające wczesną diagnozę raka piersi. Z kolei w badaniu przeprowadzonym przez F. Vahabi i współpracowników zidentyfikowano za pomocą spektroskopii rezonansu magnetycznego związku (pirydoksynę, glicynę, cholesterol, kwas taurocholowy, estry cholesterolu i deoksyinozynę) różnicujące kolejne stopnie zaawansowania raka jelita grubego

W związku z powyższym, wybór tematu rozprawy doktorskiej należy uznać za bardzo aktualny.

Rozprawa doktorska lekarz Klaudii Cieśluk liczy 96 stron standardowego maszynopisu według typowego, powszechnie akceptowanego układu, który obejmuje: wstęp, w tym wprowadzenie, cele pracy, materiały i metodykę, wyniki wraz z ich omówieniem, dyskusję, wnioski, streszczenie, wykaz cytowanego piśmiennictwa, spis tabel i rycin.

Autorka we wstępie zamieściła obszerny wykaz skrótów, pomocny w dalszej lekturze rozprawy. Streszczenie pracy zostało przetłumaczone na język angielski.

We wstępie pracy autorka w sposób szeroki, dość książkowy, jednak wydaje się potrzebny dla dobrego zrozumienia dalszych części rozprawy, opisuje podstawy rozpoznania, diagnostyki i postępowania terapeutycznego u chorych z rozpoznaniem szpiczaka plazmocytoowego i innych dyskracji plazmocytoowych. W rozdziale tym doktorantka nie zamieściła aktualnej klasyfikacji WHO z 2022r co wydawało by się słuszne, jednak z uwagi na fakt prowadzenia analizy naukowej w latach 2015-2016r jest to usprawiedliwione, nie wpływa także na jakość merytoryczną rozprawy doktorskiej.

We wstępie doktorantka przedstawiła w sposób przejrzysty i rzeczowy informacje na temat znanych mechanizmów powstawania dyskrazji plazmocytowych. W dalszej części rozprawy doktorantka znajdujemy dane o fizjologii, patofizjologii nowotworów, szczególną uwagę poświęcając wynikom analiz naukowych innych badaczy dotyczących znaczeniu prognostycznemu metabolomiki, w tym promotora pracy, dr hab. n. med. Jarosława Piszczka,

W oparciu o przesłanki zawarte we wstępie Doktorantka sformułowała cele badania. Dla zrealizowania postawionych celów, po uzyskaniu stosownych zgód Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku o nr. R-I-002/611/2018 doktorantka przeprowadziła analizy naukowe.

Materiał do badania stanowiła krew żylna pobierana na czczo. W badaniu wzięło udział łącznie 100 osób. Grupę badaną stanowili pacjenci Kliniki Hematologii Uniwersyteckiego Szpitala Klinicznego w Białymstoku hospitalizowani w latach 2015-2016, z nowo rozpoznanym MGUS (30 osób) oraz szpiczakiem plazmocytowym (50 chorych), w różnym stadium zaawansowania choroby. Obie grupy pacjentów z dyskrazjami plazmocytowymi były zbliżone pod względem mediany wieku. Kontrolę stanowiła dobrana pod względem struktury płci i wieku grupa osób zdrowych – dawców krwi i wolontariuszy (20 osób).

Badania przeprowadzono w Centrum Badań Klinicznych Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku. Profil metabolitów mierzony był przy pomocy chromatografu cieczowego sprzężonego ze spektrometrią mas z kwadrupolem i analizatorem czasu przelotu (LC-QTOF-MS, model 6546, Agilent Technologies). Do analiz wykorzystana została metoda metabolicznego odcisku palca. Próbkę otrzymane od dwójki pacjentów zostały wyłączone z badania ze względu na ich uszkodzenie w trakcie przechowywania materiału.

Doktorantka po wstępnym opracowaniu danych uzyskała 1155 cech metabolicznych: 745 w jonizacji dodatniej i 410 w jonizacji ujemnej. Ostatecznie zidentyfikowała 104 związki różnicujące profile metabolomiczne pacjentów w poszczególnych grupach. Szczegółowo przedstawiła informacje dotyczące powyższych związków z podziałem na klasy, do których należą oraz tendencją zmian w konkretnych porównaniach grup (MGUS vs. grupa kontrolna, MM vs. grupa kontrolna, MM vs MGUS).

Przeprowadzone analizy pozwoliły doktorantce na zidentyfikowanie związków różnicujących profile metabolomiczne pacjentów z MGUS, szpiczakiem plazmocytowym oraz biorących udział w badaniu osób zdrowych. Stwierdzono istotnie statystycznie różnice w następujących grupach związków: karnityny, sfingomieliny, fosfatydylocholiny, lizofosfatydylocholiny, fosfatydyloetanolaminy, lizofosfatydyloetanolaminy, lizofosfatydyloinozytole oraz w stężeniu takich związków jak kwas arachidonowy, eikozapentaenowy, karboksy-metylo-propylo-furanopropanowy i benzotiazoletion.

Najwyraźniejsze różnice pomiędzy profilami metabolomicznymi porównywanych grup doktorantka wykazała w stężeniach karnityn. Karnityny, a właściwie acylokarnityny, czyli estry l-karnityny i kwasów tłuszczowych, są nośnikami długołańcuchowych kwasów tłuszczowych niezbędnymi do ich do macierzy mitochondrialnej. Wewnątrz mitochondrium kwasy tłuszczowe mogą z kolei zostać rozłożone do acetylo-CoA w procesie zwanym β -oksydacją, dzięki czemu po wejściu do cyklu Krebsa mogą posłużyć do produkcji energii. Metabolizm acylokarnityn jest związany nie tylko z transportem kwasów tłuszczowych, ale również odgrywa kluczową rolę w regulacji równowagi wewnątrzkomórkowego metabolizmu cukrów i lipidów.

W mojej ocenie zaplanowanie doświadczeń oraz ich realizacja świadczą o dobrym przygotowaniu metodycznym Doktorantki. Dyskusja przeprowadzona została przez Doktorantkę w sposób dojrzały. Doktorantka odniosła własne wyniki do dostępnych danych literaturowych, a sposób przeprowadzenia analizy uzyskanych wyników potwierdza dobre przygotowanie merytoryczne i szeroką wiedzę w zakresie tematyki prowadzonych badań, w których niewątpliwą pomocą było zapewne doświadczenie promotora pracy.

Przeprowadzone badania stały się podstawą do sformułowania przez Autorkę 6 wniosków.

1. Przeprowadzona analiza statystyczna niecelowaną metodą metabolomicznego odcisku palca pozwoliła na określenie istotnych różnic w profilach metabolomicznych w poszczególnych grupach badanych (MGUS, MM, grupa kontrolna).
2. Zmiany w stężeniu karnityn oraz fosfatydyloetanolamin zachodzące w grupie pacjentów z MGUS oraz MM mogą mieć związek z intensywną proliferacją, a co za tym idzie - zwiększonym zapotrzebowaniem energetycznym wysoce aktywnych metabolicznie klonalnych plazmocytoów.
3. Spadek stężenia kwasu arachidonowego w grupie MGUS i MM może mieć związek z jego zwiększoną degradacją i produkcją aktywnych metabolitów sprzyjających karcynogenezie, czemu może dodatkowo sprzyjać obniżony poziom kwasu eikozapentaenowego.

4. Obserwowane zmniejszenie stężeń metabolitów z grupy sfingomielin i fosfatydylocholiny oraz wzrost stężeń związków takich jak PC (34:3) czy LPE (16:0) u pacjentów z MM w porównaniu do grupy MGUS może świadczyć o udziale tych szlaków w transformacji choroby.
5. Poznanie zachodzących zmian w zakresie metabolomiki w trakcie transformacji MGUS do pełnoobjawowego MM może zostać w przyszłości wykorzystane do opracowania nowych markerów nowotworowych, ulepszenia stratyfikacji, wyodrębnienia grupy pacjentów z MGUS, u których należałoby rozważyć wcześniejsze włączenie leczenia w celu prewencji uszkodzenia narządowego związanego z progresją do MM oraz ujawnić nowe cele terapeutyczne przy opracowywaniu nowych terapii przeciwszpizakowych.

Wniosek 6 wydaje się szczególnie ważny klinicznie w kontekście uzyskanych wyników

6. Konieczne jest przeprowadzenie kolejnych badań w celu potwierdzenia zaobserwowanych zmian i określenia ich znaczenia w dyskrazjach plazmocytowych.

W podsumowaniu stwierdzam, że rozprawa doktorska lekarz Klaudii Cieśluk charakteryzuje się trafnością wyboru tematu. Doktorantka trafnie dokonała wyboru dostępnej bibliografii oraz sformułowała cele planowanych badań naukowych i wnioski z nich wyphywających. Zawarta w rozprawie analiza tematu jest spójna i przyczynia się do lepszego poznania omawianej tematyki, toteż jest cennym uzupełnieniem dostępnego piśmiennictwa naukowego. Autorka nie ustrzegła się błędów edycyjnych, które jednak nie umniejszają wartości pracy i zostały szczegółowo omówione z doktorantką. Zapewne trafniej byłoby użyć składni „Stężenia utrzymują się na poziomie” niż sformułowania „poziomy stężeń”, jednak nie ma to znaczenia dla wartości merytorycznej dysertacji. Na pozytywne podkreślenie zasługuje efekt wizualny pracy, zwłaszcza staranność wykonanych rycin i tabel.

Autorka w pełni zrealizowała zaplanowany cel, dobrze opanowała warsztat badawczy i wykazała dobre przygotowanie merytoryczne. Rozprawa ma dużą wartość poznawczą i stanowi podstawę do kontynuowania badań naukowych szczególnie istotnych klinicznie w tej dziedzinie.

Stwierdzam, że przedłożona do recenzji praca autorstwa lekarz Klaudii Cieśluk spełnia wszystkie warunki określone w art. 13 ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 20017 r. poz. 1789) oraz art. 179 ust. 1 ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U z 2018r poz. 1669 z późn.zm). Tym samym zwracam się do Senatu

*Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku o dopuszczenie lekarz Klaudii Cieśluk do dalszych etapów
przewodu doktorskiego.*

dr hab. n. med. Marzena Wątek