

Prof. dr hab. med. Iwona Hus

Klinika Hematologii

Państwowy Instytut Medyczny MSWiA



RPLW/8763/2023
Data: 2023-10-02
UMB

Recenzja rozprawy doktorskiej lek. Aliny Urbanowicz z Oddziału Onkologii Klinicznej i Hematologii Szpitala Wojewódzkiego im. dr. Ludwika Rydygiera w Suwałkach pt. „Ocena profilu metabolomicznego u chorych na przewlekłą białaczkę limfocytową” przygotowanej pod kierunkiem dr hab. med. Jarosława Piszczca

Przewlekła białaczka limfocytowa (*chronic lymphocytic leukemia*, CLL) jest nowotworem układu chłonnego wywodzącym się z dojrzałych limfocytów B. CLL jest najczęstszą białaczką na zachodniej półkuli. Etiologia choroby jest nieznana, nie wykazano związku z jej występowaniem z narażeniem na czynniki środowiskowe lub zawodowe. Charakterystyczną cechą CLL jest heterogeny przebieg kliniczny, szczególnie trudny do przewidzenia u chorych we wczesnych fazach klinicznych białaczki. Do najważniejszych czynników prognostycznych w CLL, których oznaczenie przed rozpoczęciem terapii jest zalecane przez wytyczne polskie i międzynarodowe należą parametry ryzyka cytogenetycznego i molekularnego tj. zaburzenia genu *TP53* (delecje 17p obejmujące locus genu *TP53* i mutacje genu *TP53*) oraz stan mutacji genów dla części zmiennej łańcucha ciężkiego immunoglobulin (*IGHV*). Zaburzenia genu *TP53* i stan mutacji *IGHV* mają jednocześnie znaczenie prognostyczne i predykcyjne, szczególnie istotne w odniesieniu do celowości zastosowania klasycznej immunochemioterapii, a więc odgrywają obecnie istotną rolę przy decyzji o wyborze metody leczenia. Wobec wielu niewiadomych zarówno w odniesieniu do patogenezy CLL jak rokowania chorych nadal jednak poszukiwane są parametry, które pozwoliłyby lepiej poznać biologię białaczki, szczególnie, że pozostaje ona nieuleczalna przy pomocy konwencjonalnych metod leczenia. W swojej pracy doktorskiej lek. Alina Urbanowicz jako cel badawczy postawiła sobie określenie różnic w profilu metabolomicznym między chorymi na CLL a grupą kontrolną oraz między grupami chorych ze stabilną postacią CLL oraz postacią progresywną, u których stwierdza się

wskazania do rozpoczęcia leczenia przeciwnowotworowego. Metabolomika jest jedną nowych dziedzin nauki, w której przy pomocy zaawansowanych metod rozdzielczych i analitycznych analizuje się profil niskocząsteczkowych związków znajdujących się w próbce materiału biologicznego (najczęściej w płyny ustrojowe), które składają się na tzw. metabolom. Poprzez wyodrębnienie związków, jak również również szlaków metabolicznych podejmowane są próby określenia ich roli w patogenezie i progresji wielu chorób, w tym nowotworowych. Publikacji dotyczących metabolomiki i CLL jest nadal bardzo niewiele, dlatego uważam, że jest to ciekawy temat badawczy z uwagi na możliwość uzyskania nowych informacji na temat etiopatogenezy CLL jak również określenia nowych celów terapii.

Przedstawiona do recenzji praca ma układ typowy dla rozprawy doktorskiej, zawiera 121 stron tekstu, zawiera 28 rycin i 17 tabel. Spis piśmiennictwa obejmuje 175 odpowiednio dobranych i cytowanych pozycji.

Obszerny Wstęp pracy zawarty na 34 stronach składa się z dwóch części. W pierwszej Autorka przedstawia w szeroki sposób aktualny stan wiedzy na temat patogenezy i obrazu klinicznego CLL, skupiając się na rokowaniu, czynnikach prognostycznych i predykcyjnych. Druga część Wstępu poświęcona jest metabolomice. Dla mnie jest to zagadnienie stosunkowo nowe i mało znane, dlatego tę część przeczytałam ze szczególną uwagą. Autorka w interesujący i przejrzysty sposób opisuje czym ogólnie zajmuje się metabolomika, oraz jakie metody są wykorzystywane w analizach, uzasadniając następnie, dlaczego zajęła się badaniami nad profilem metabolomicznym u chorych na CLL. Całość Wstępu świadczy o doskonałej znajomości zagadnień stanowiących przedmiot badań. W dalszej części rozprawy Autorka przedstawiła cel podjętych badań, którym była ocena profili metabolomicznych w osoczu pacjentów z przewlekłą białaczką limfocytową ze szczególnym uwzględnieniem różnic między chorymi ze stabilną i progresywną postacią choroby (czyli bez i ze wskazaniami do rozpoczęcia leczenia) oraz identyfikacja potencjalnych biomarkerów progresji choroby.

Grupę badaną stanowiło 59 chorych na CLL, w tym 29 ze wskazaniami i 30 bez wskazań do leczenia białaczki. Wszyscy chorzy pozostawali pod opieką Oddziału Onkologii Klinicznej i Hematologii Szpitala Wojewódzkiego w Suwałkach oraz Kliniki

Hematologii USK w Białymstoku. Charakterystyka grupy badanej obejmowała parametry takie jak: stadium kliniczne CLL, liczbę limfocytów krwi obwodowej, aktywność LDH i ryzyko cytogenetyczne. Ryzyko cytogenetyczne wysokie definiowano jako obecność delecji 17p lub 11q. Myślę, że kontynuując te interesujące badania warto byłoby uwzględnić inne czynniki złego rokowania jak mutacja *TP53* i status mutacji genów IGHV. Grupę kontrolną stanowiło 20 zdrowych ochotników, dobranych względem płci i wieku. Analizy zostały wykonane w Centrum Badań Klinicznych Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku. Materiał do badań stanowiła krew żylna, w której oznaczano stężenie związków drobnocząsteczkowych i lipidowych. Pomiar metabolitów zawartych w osoczu obejmował dwa rodzaje pomiarów: analizy LC-MS/MS (*liquid chromatography – mass spectrometry/mass spectrometry*-chromatografia cieczowa sprzężona z tandemową spektroskopią masową) dla aminokwasów i amin biogennych oraz analizy FIA-MS/MS (*Flow injection analysis–mass spectrometry/mass spectrometry*-Analiza wstrzykowa sprzężona z tandemową spektrometrią masową) dla monosacharydów i związków lipidowych. Metodyka badań jest adekwatna do założonego celu, opisana w sposób szczegółowy i czytelny. W pracy zastosowano prawidłowe metody analizy statystycznej.

W przeprowadzonych badaniach Doktorantka wykazała istotne różnice w stężeniu oznaczanych substancji zarówno między grupą badaną a grupą kontrolną jak i między chorymi z i bez wskazań do leczenia CLL. U pacjentów z CLL stężenie kwasu glutaminowego (Glu) i asparginowego (Asp), proliny (Pro) i ornityny (Orn) było niższe a stężenie glutaminy (Gln), asparaginy (Asn), metioniny (Met), argininy (Arg), histydyny (His), lizyny (Lys) wyższe w porównaniu do grupy kontrolnej. Największe różnice dotyczyły glutaminy (Gln) - wzrost stężenia do 689%, oraz metioniny (Met) - wzrost do 134%. Tak znacząco wyższe stężenie glutaminy u chorych na CLL sugeruje, że byłby to ciekawy kierunek badań, szczególnie u chorych z opornością na nowe terapie celowane, takie jak inhibitory kinazy Brutona czy inhibitory Bcl-2. Drugim wstępnym wnioskiem Autorki, który wymaga potwierdzenia w dalszych badaniach, jest przestrzeżenie chorych przed suplementacją glutaminy w diecie. W przeprowadzonych badaniach wykazano również niższe stężenie sulfotlenku metioniny (Met-SO), 4-trans- hydroksyproliny (t4-OH-Pro) i sarkozyny oraz wyższe stężenie SDMA, ADMA, putrescyny, tauryny i kreatyniny u pacjentów z CLL w porównaniu do kontroli. Podobnie, stężenie wszystkich badanych karnityn był wyższe

u pacjentów z CLL w porównaniu do kontroli, przy czym w przypadku acetylo-L-karnityny (C2) wzrost wynosił 308%. Stężenie wszystkich oznaczanych lizoPC było mniejsze a wszystkich sfingomielin wyższe u pacjentów z CLL w porównaniu do grupy kontrolnej. W kolejnych badaniach Autorka wykazała, że zarówno u pacjentów niewymagających jak i wymagających terapii zaburzenia dotyczyły tych samych szlaków metabolicznych, chociaż waga poszczególnych szlaków i ich istotność różniły się pomiędzy dwoma grupami chorych. Może to sugerować, że większe znaczenie w odniesieniu do różnic w profilu metabolomicznym ma samo rozpoznanie białaczki niż jej zaawansowanie, szczególnie, że chorzy w obu grupach nie otrzymali jeszcze leczenia. Inną przyczyną może być mała liczebność grup chorych, o czym pisze sama Autorka opisując ograniczenia badania. Największe różnice między dwiema grupami chorych na CLL dotyczyły biosyntezy i metabolizmu argininy i proliny oraz metabolizmu histydyny. Stężenie glicyny (Gly), ornityny (Orn) i fenylalaniny (Phe) było wyższe podczas gdy stężenie tryptofanu (Trp) było niższe u chorych wymagających terapii w porównaniu do pacjentów ze stabilną CLL. Na szczególną uwagę zasługuje wyobębienie trzech metabolitów różnicujących chorych niewymagających i wymagających leczenia: ADMA, SDMA, LizoPC 18:2. Stężenie dwóch pierwszych związków było wyższe u chorych wymagających terapii natomiast w przypadku LizoPC 18:2 obserwowano zmniejszenie stężenia wraz z postępem choroby. W wykonanych badaniach ADMA w największym stopniu różnicował dwie grupy pacjentów, na co wskazuje zarówno najniższa p-wartość, najwyższy procent zmiany, jak również najwyższa wartość AUC. Na podstawie tych danych Autorka sugeruje potrzebę dalszych badań nad potencjalnym znaczeniem i możliwością zastosowania leków, które wpływają na obniżenie ADMA, ja chociażby leki stosowane w leczeniu nadciśnienia czy hipercholesterolemii. W odniesieniu do LizoPC 18:2, Autorka zwraca uwagę na fakt, że obniżone stężenie LizoPC 18:2 uważane jest za czynnik predykcyjny różnych stanów związanych ze starzeniem się organizmu, takich jak obniżenie wydolności wysiłkowej, zaburzona tolerancja glukozy, choroba wieńcowa, zaburzenia pamięci.

Wynikiem badań jest sześć wniosków stanowiących próbę odpowiedzi na pytania zawarte w celu pracy oraz podsumowanie przeprowadzonych analiz. Omówienie wyników i dyskusja świadczą o dobrym przygotowaniu Doktorantki do podjętego tematu. W dyskusji Autorka krytycznie ustosunkowała się do wyników badań własnych,

w oparciu o najnowszą wiedzę próbując logicznie je interpretować. Potrafiła również przedstawić słabości badania, co również świadczy o Jej dojrzałości naukowej. We wnioskach warto byłoby bardziej odnieść się do interpretacji uzyskanych wyników, którą Doktorantka przedstawia w Dyskusji zamiast tylko je streścić.

Praca została przygotowana z niezwykłą starannością, na uznanie zasługuje starannie przez Autorkę przygotowana część ilustracyjna, zarówno w odniesieniu do Wstępu, jak i Wyników. Drobne uwagi mają jedynie charakter edytorski i dotyczą np. odpowiedniego zastosowania określeń typu „liczba” zamiast „ilość” limfocytów, oraz „stężenie” zamiast „poziom”.

Reasumując uważam, że przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska lek. Aliny Urbanowicz pt. „Ocena profilu metabolomicznego u chorych na przewlekłą białaczkę limfocytową” spełnia warunki określone w art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (t.j. Dz. U. Z 2017r., poz. 1789 ze zm.), §3 rozporządzenia Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 19 stycznia 2018r. Badania wykonane w ramach pracy doktorskiej przyniosły cenne obserwacje, istotne dla dalszego poznania biologii i etiopatogenezy przewlekłej białaczki limfocytowej, stanowiąc przesłankę do dalszego rozwoju badań nad metabolomiką u chorych na CLL Doktorantka wykazała się zarówno wiedzą teoretyczną jak również umiejętnością samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Z uwagi na powyższe mam zaszczyt i przyjemność przedłożyć Senatowi Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku wniosek o dopuszczenie lek. Alinę Urbanowicz do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

23 września 2023



