

**Ocena rozprawy doktorskiej lek. Aliny Urbanowicz pod tytułem:**

**„Ocena profilu metabolomicznego u chorych na przewlekłą białaczkę limfocytową”**

Przewlekła białaczka limfocytowa (PBL) to najczęściej występujący nowotwór układu chłonnego u dorosłych chorych. Nie wszyscy pacjenci wymagają leczenia. Jest ono wprowadzane w zaawansowanych stadiach choroby. Możliwe, że w przyszłości będzie ono stosowane na wcześniejszym etapie rozwoju białaczki u chorych z obecnością czynników agresywnego przebiegu choroby. Zróżnicowany przebieg kliniczny PBL u chorych z tym samym stopniem zaawansowania stwarza trudność w podejmowaniu decyzji o rozpoczęciu i rodzaju leczenia. Dostępność obecnie nowoczesnych form terapii o różnej aktywności, ale także o różnym ryzyku powikłań, uzasadnia poszukiwanie kolejnych czynników prognozujących przebieg choroby, a przez to skutecznych metod optymalizacji strategii postępowania z chorymi. Jest to szczególnie ważne u pacjentów we wcześniejszych stadiach zaawansowania, którzy potencjalnie mogliby odnieść korzyść z wcześnie wdrożonej terapii. Należą do nich: obecność delecji 17p lub mutacji TP53 oraz brak mutacji genów dla łańcuchów ciężkich immunoglobulin. Stale trwają badania nad wykryciem u pacjentów innych nieprawidłowości mających znaczenie dla przebiegu choroby, określenia czasu włączenia terapii przeciwnowotworowej i poszukiwania nowych form leczenia. Mogą do nich należeć wyniki uzyskane z analiz metabolomicznych mogące prowadzić do lepszego zrozumienia zjawisk zachodzących na poziomie komórkowym w nowotworze. Jest to, w odróżnieniu od podejścia redukcjonistycznego, strategia całościowa, wymagająca interdyscyplinarnej współpracy wielu specjalistów. Pozwala na poznanie procesów wewnątrzkomórkowych, a następnie daje nadzieję na możliwość wpływu na te procesy za pomocą środków farmakologicznych. Wśród możliwych zastosowań badań metabolomicznych w medycynie wymienia się m.in.:

- poszukiwanie nowych leków,
- indywidualizację terapii,
- monitorowanie postępów leczenia,

Metabolom, to zbiór metabolitów (peptydy, lipidy, kwasy organiczne, węglowodany, aminokwasy, nukleotydy, sterydy, witaminy i inne), które charakteryzują się różnymi właściwościami fizykochemicznymi. Liczba dotychczas poznanych metabolitów w organizmie ludzkim jest względnie mała w porównaniu z liczbą genów czy białek. Jednakże



ilość czynników wewnętrznych i zewnętrznych wpływających na poziom metabolitów w płynach biologicznych i tkankach jest ogromna. Metabolom jest więc układem dynamicznym, który należy rozpatrywać jako finalną odpowiedź organizmu na czynniki środowiskowe, modyfikacje genetyczne, zaburzenia w mikroflorze jelit, zmienną aktywność katalityczną enzymów itp., itd.

Metabolomika znalazła szerokie zastosowanie w medycynie. Przy jej pomocy bada się np. wpływ żywności i mikroorganizmów zasiedlających przewód pokarmowy na zdrowie ludzi. Najważniejszym jednak obszarem, gdzie metoda ta ma szczególną wartość, jest poszukiwanie biomarkerów chorób, wyjaśnianie patomechanizmów rozwoju choroby, ustalanie nowych celów terapeutycznych oraz monitorowanie przebiegu leczenia. Profil metabolitów zmierzony u chorych na daną chorobę może być porównany z profilem uzyskanym w grupie kontrolnej. Od dawna wiadomo bowiem, że komórki nowotworowe, niezależnie od rodzaju nowotworu i jego umiejscowienia, wykazują wysoce specyficzny (choć nie do końca poznany) profil metaboliczny.

Jak dotąd przeprowadzono relatywnie niewiele badań metabolomicznych u chorych z przewlekłą białaczką limfocytową, co więcej często wyniki tych badań są niespójne i niejednoznaczne.

Stąd też celami pracy lekarz Aliny Urbanowicz były:

1. ocena profili metabolomicznych w osoczu pacjentów z przewlekłą białaczką limfocytową ze szczególnym uwzględnieniem różnic między chorymi niekwalifikującymi i kwalifikującymi się do terapii.
2. identyfikacja potencjalnych biomarkerów progresji choroby.

Na przeprowadzenie badania lek. Alina Urbanowicz uzyskała zgodę Komisji Bioetycznej (uchwała nr: R-I-002/611/2018) oraz uzyskała wsparcie finansowe ze środków statutowych Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku.

Badaniem objęto 59 chorych na przewlekłą białaczkę limfocytową: 30 niewymagających leczenia (CLL\_N) i 29– wymagających leczenia (CLL\_T). Byli to chorzy Oddziału Onkologii Klinicznej i Hematologii Szpitala Wojewódzkiego w Suwałkach oraz Kliniki Hematologii USK w Białymstoku. Kontrolę stanowiła dobrana pod względem struktury płci i wieku grupa

osób zdrowych – dawców krwi i wolontariuszy (20 osób). Wszystkie osoby włączone do badania, po przedstawieniu założeń pracy, wyraziły świadomą, pisemną zgodę na udział w projekcie.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska obejmuje wraz ze streszczeniami, wykresami, rycinami i tabelami 120 stron wydruku komputerowego. Układ pracy przedstawiony w spisie treści jest poprawny.


We **wstępie** Autorka szczegółowo omawia aktualny stan wiedzy na temat przewlekłej białaczki limfocytowej ze szczególnym uwzględnieniem czynników ryzyka oraz metabolomiki i jej potencjalnym zastosowaniu w hematologii i onkologii.

Postawione **cele pracy** należy uznać za godne realizacji.

**Pacjenci i metody** stanowią kolejny rozdział, szczegółowo opisujący przebieg badania.

**Wyniki** podane są w osobnym rozdziale w formie graficznej i opisowej, pozwoliły one na sformułowanie następujących wniosków, które zostały przedstawione w sposób opisowy i stanowią odpowiedzi na postawione cele pracy:

1. Przeprowadzona analiza metabolomiczna pozwoliła na wykazanie istotnych różnic między profilami pacjentów chorych na PBL oraz osobami zdrowymi, oraz różnic między chorymi niewymagającymi i wymagającymi leczenia.
2. Największe różnice u pacjentów na PBL w porównaniu do kontroli zanotowano w stężeniu glutaminy, putrescyny, acylokarnityn,szcz. acetylokarnityny, niektórych diacylofosfatydylocholin: PC aa 36:0, 38:0, 38:5, 38:6, 40:6 oraz acyloalkilofosfatydylocholin: PC ae 36:4, 36:5, 38:5 i 38:6 (wzrost stężenia), a także spadek stężenia wszystkich zmierzonych lizofosfatydylocholin.
3. Przeprowadzona analiza szlaków metabolicznych wskazuje, że zaburzone szlaki są takie same u chorych niewymagających i wymagających leczenia, ale występuje różnica w wadze i istotności tych szlaków między grupami. Największe różnice dotyczą biosyntezy i metabolizmu argininy oraz metabolizmu proliny i histydyny.
4. W analizie statystycznej wytypowano 3 związki chemiczne najbardziej różnicujące grupę CLL\_N i CLL\_T. Są to 2 formy dimetylowanej argininy: ADMA i SDMA (wzrost poziomu) oraz lizofosfatydylicholina 18:2 (spadek poziomu). Łączna analiza obejmująca te metabolity oraz 2 parametry kliniczne: ilość limfocytów



i stadium RAI pozwoliła na stworzenie jednego klasyfikatora, dla którego AUC krzywej ROC wyniosło aż 0,983.

5. Zestaw AbsoluteIDQ p180 firmy Biocrates okazał się użytecznym narzędziem do przeprowadzenia analizy metabolomicznej, łączącej cechy analizy niecelowanej i celowanej, przez umożliwienie ilościowego pomiaru 180 metabolitów w sposób uproszczony i wystandaryzowany.
6. Zasadne jest przeprowadzenie kolejnych badań metabolomicznych na większych grupach chorych w celu potwierdzenia zmian na poziomie metabolomu zachodzących w przebiegu tej choroby dla lepszego zrozumienia jej patogenezy.

W **Omówieniu wyników i dyskusji** Autorka w sposób zwięzły i szczegółowy ocenia uzyskane przez siebie wyniki i porównuje je z rezultatami badań przeprowadzonych, opublikowanych przez innych lekarzy.

**Piśmiennictwo** jest bardzo rozbudowane, dobrane właściwie, w zdecydowanej większości pochodzi z ostatnich 10 lat.

Podsumowując ocenę rozprawy doktorskiej należy stwierdzić, że stanowi ona kolejny krok w zastosowaniu metabolomiki w poszukiwaniu nowych czynników prognostycznych i predykcyjnych, wskazówek co do czasu włączenia terapii u chorych z przewlekłą białaczką limfocytową.

W pracy lekarz Alina Urbanowicz wykazała się znajomością warsztatu jakim powinien się posługiwać pracownik naukowy- lekarz. Na wyróżnienie zasługuje perfekcyjne wykorzystanie skomplikowanych metod statystycznych do opracowania uzyskanych wyników.

Zwraca uwagę szereg uzyskanych rezultatów może stanowić podstawy do dalszych badań nad opracowaniem nowych form terapii PBL, nowych czynników prognostycznych i predykcyjnych w tej jednostce chorobowej.

Na uwagę zasługują:

- A. wykorzystanie komercyjnego zestawu do ilościowego pomiaru metabolitów, **AbsoluteIDQ p180 firmy Biocrates**. Umożliwia on jednoczesny pomiar



180 związków przynależących do kilku klas metabolitów. Wśród metabolitów drobnocząsteczkowych jest 21 aminokwasów, 21 amin biogennych oraz 1 monosacharyd (glukoza). Natomiast wśród lipidów jest 40 acylokarnityn, 90 glicerofosfolipidów oraz 15 sfingomielin. Jego dostępność na rynku znacznie ułatwia lekarzowi praktykowi wykorzystanie metabolomiki w klinicznych badaniach naukowych i porównywanie rezultatów badań pochodzących od różnych autorów.

- B. wykazanie w analizie metabolomicznej istnienia statystycznie istotnych różnic między badanymi grupami: przewlekła białaczka limfocytowa vs kontrola, przewlekła białaczka limfocytowa- chorzy nie wymagający leczenia vs kontrola, przewlekła białaczka limfocytowa- chorzy wymagający leczenia vs kontrola oraz przewlekła białaczka limfocytowa- chorzy nie wymagający leczenia vs przewlekła białaczka limfocytowa- chorzy wymagający leczenia w zakresie następujących grup metabolitów: aminokwasy, aminy biogenne, karnityny, glicerofosfocholin, sfingomieliny.

Na szczególną uwagę zasługuje fakt wyselekcjonowania 3 metabolitów różnicujących pacjentów niewymagających i wymagających leczenia: ADMA, SDMA, LisoPC 18:2. Poziom dwóch pierwszych związków rósł u chorych CLL\_T, natomiast dla LisoPC 18:2 obserwowano spadek poziomu wraz z postępem choroby. Na uwagę zasługuje fakt, że obniżone stężenie LisoPC 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.

**Powyższe fakty stanowią moim zdaniem podstawę do wyróżnienia pracy.**

Z obowiązku recenzenta zwracam uwagę na fakt, że wniosek nr 4 jest w swojej zdecydowanej części wynikiem i wymaga preredagowania.

Ograniczenia pracy wskazała sama Autorka, należą do nich:

1. Stosunkowo mała liczebność grup badanych.
2. Ograniczona liczba grup badanych metabolitów narzucona przez producenta zestawu AbsoluteIDG p180.

3. Oznaczanie metabolitów w osoczu krwi, a nie bezpośrednio w limfocytach białaczkowych.
4. Odmienny metabolizm limfocytów PBL we krwi obwodowej i w tkankach limfatycznych, gdzie dochodzi prawdopodobnie do przeprogramowania szlaków metabolicznych w wyniku wpływu bodźców z mikrośrodowiska.



Pomimo istnienia tych niedoskonałości pracę oceniam bardzo pozytywnie ze względu na zaprezentowany materiał oraz istotne klinicznie refleksje nad nim.

Rozprawa doktorska 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.) oraz art. 179 ust. 1 ustawy z dnia 3 lipca 2018r. Przepisy wprowadzające ustawę- Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1669 z późn. zm.).

Biorąc pod uwagę powyższe zwracam się zatem do Senatu Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku o dopuszczenie lek. Aliny Urbanowicz do dalszych etapów przewodu doktorskiego, wnioskuję o wyróżnienie jej rozprawy doktorskiej. Jednocześnie dziękuję za przywilej recenzowania tej pracy.

Prof. dr hab. n. med.  
Piotr Rzepecki  
SPECJALISTA CHOROÓB WEWNĘTRZNYCH  
TRANSPLANTOLOGII KLINICZNEJ, HEMATOLOG  
Nr. ZUS 7 7 7 6 8 5 9