Prof. dr hab. Lidia Usnarska-Zubkiewicz
Katedra i Klinika Hematologii, Nowotworów Krwi i Transplantacji Szpiku
Wrocław, ul Pasteura 4, Tel. 71 784 25 76

Recenzja rozprawy
na stopień doktora nauk medycznych
mgr Wioletty Romaniuk
pt "Ocena przydatności oznaczenia proteasomów w monitorowaniu leczenia chorych na szpiczaka plazmocytowego"

Zgodnie z uchwałą Rady Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku o powołaniu mnie na recenzenta w/w rozprawy mam zaszczyt przedstawić swoją opinię.

1. Wartość celu badawczego

Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska dotyczy ważnego problemu medycznego jakim jest wpływ leków stosowanych u chorych na szpiczaka plazmocytowego na parametry proteasomu. Proteasom jest kompleksem enzymów proteolitycznych, którego podstawową funkcją jest degradacja białek związanych z ubikwityną. Substratami dla proteasomu są m.in. mediatory szlaków metabolicznych, które w klonalnych plazmocytach są zaburzone. Zablokowanie proteasomu upośledza aktywność jądrowego czynnika transkrypcyjnego i prowadzi do apoptozy komórek. Pierwszym inhibitorem proteasomu zastosowanym w terapii chorych na szpiczaka plazmocytowego był bortezomib. Wg Durie zastosowanie bortezomibu było kamieniem milowym w leczeniu chorych na szpiczaka plazmocytowego. Badania wykazały bowiem, że bortezomib wykazuje silne działanie hamujące nawet w opornych liniach szpiczakowych, zwiększa aktywność przeciwnowotworową deksametazonu i przełamuje oporność komórek szpiczakowych m.in. na doksorubicynę i melfalan.

Głównym celem przedstawionej mi do recenzji pracy była ocena aktywności chymotrypsynopodobnej (ChT-L) i stężenia proteasomu u chorych na szpiczaka plazmocytowego, w aspekcie ich wartości prognostycznej. Doktorantka otrzymała również za zadanie porównanie aktywności ChT-L i stężenia proteazom w osoczu i surowicy u osób zdrowych i chorych na szpiczaka plazmocytowego, ocenę wpływu chemioterapii na w/w parametry w aspekcie określenia ich przydatności w monitorowaniu terapii i możliwości

zastosowania jako czynników predykcyjnych odpowiedzi na leczenie. Tak więc problemy i pytania postawione przez Doktorantkę są klinicznie bardzo ważne, naukowo, u chorych na szpiczaka plazmocytowego, niedostatecznie opracowane.

2. Poprawność metodyczna

Doktorantka przeprowadziła 2 eksperymenty. Pierwszy dotyczył porównania aktywności ChT-L i stężenia proteasomu w osoczu i surowicy osób zdrowych i chorych na szpiczaka plazmocytowego. Badaniem objęto 28 chorych, u których, na różnych etapach terapii pobrano łącznie 70 próbek osocza i surowicy. Grupę kontrolną stanowiło 31 zdrowych ochotników.

W drugim eksperymencie, w którym oceniano przydatność oznaczania aktywności ChT-L i stężenia proteasomu w monitorowaniu leczenia chorych na szpiczaka plazmocytowego do badania włączono 78 pacjentów ze świeżo rozpoznaną chorobą w wieku 38 - 80 lat, oraz 36 zdrowych ochotników w wieku 42-91 lat. Chorzy na szpiczaka zostali podzieleni na dwie podgrupy, w zależności od sposobu leczenia: 26 osób leczono wg schematu CTD (cyklofosfamid, talidomid, deksametazon), u pozostałych 52 pacjentów w leczeniu stosowano bortezomib w różnych schematach. W każdej podgrupie wyróżniono osoby które odpowiedziały na leczenie i uzyskały przynajmniej remisję częściową (PR), bądź nie uzyskały remisji i orzeczono u nich stabilizację (SD) lub progresję (PD) choroby.

Wszyscy pacjenci byli diagnozowani i leczeni w latach 2015-2016 w Klinice Hematologii z Pododdziałem Chorób Naczyń Uniwersyteckiego Szpitala Klinicznego w Białymstoku. Na przeprowadzenie badań Autorka uzyskała zgodę Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku.

Aktywność ChT-L proteasomu w osoczu i surowicy oznaczano przy użyciu fluorogennego substratu AMC w obecności SDS jako selektywnego aktywatora enzymu ChT-L. Stężenie proteasomu w osoczu i surowicy oznaczano metodą immunoenzymatyczną przy użyciu komercyjnego zestawu, postępowano zgodnie z instrukcją producenta.
Dobór i liczebność grupy badanej i kontrolnej jest satysfakcjonująca i pozwala na przeprowadzenie wiarygodnej analizy statystycznej.

Zastosowane metody oceny parametrów proteasomu są nowoczesne, prawidłowo zaprojektowane i obejmują swym zakresem postawione przez Doktorantkę cele pracy. Badanie miało charakter prospektywny, krew do badań pobierano trzykrotnie: przed leczeniem, po trzecim cyklu leczenia i po zakończeniu leczenia. W grupie kontrolnej krew pobierano jednorazowo. Ilość wykonanych oznaczeń jest satysfakcjonująca, obrazuje ogrom

wykonanej pracy i wskazuje na wysoki standard warsztatu badawczego, w którym praca ta powstała.

Zastosowane metody statystyczne są prawidłowo zaprogramowane, analiza kliniczna jest wszechstronna, wnikliwa i daje odpowiedź na problemy ujęte w celach pracy.

3. Znaczenie naukowe i praktyczne wniosków wynikających z przeprowadzonych badań

W wyniku przeprowadzonych badań Doktorantka dowiodła, że aktywność ChT-L i stężenie proteasomu u osób zdrowych jest porównywalna w surowicy i w osoczu. Natomiast w grupie chorych na szpiczaka plazmocytowego aktywność ChT-L i stężenie proteasomu były istotnie większe w osoczu w porównaniu do surowicy. Ponadto wykazano, że aktywność ChT-L proteasomu istotnie korelowała z parametrami aktywności szpiczaka tj stężeniem beta-2 mikroglobuliny, albuminy i LDH. Podobnie stężenie proteasomu oznaczane w osoczu korelowało z wskaźnikami aktywności choroby. Doktorantka udowodniła, że optymalnym materiałem do oznaczania parametrów proteasomu jest osocze, nie surowica, co jest Jej autorskim osiągnięciem.

Autorka wykazała, że zarówno mediana aktywności ChT-L jak i stężenie proteasomu w osoczu chorych ze świeżym rozpoznaniem były istotnie statystycznie większe od wartości tych parametrów znalezionych u osób zdrowych. Bardzo interesującym autorskim spostrzeżeniem doktorantki było odmienne zachowanie się aktywności ChT-L i stężenia proteasomu po leczeniu indukującym w obu analizowanych grupach. U chorych, u których zastosowano bortezomib, badane parametry zmniejszały się wraz z zastosowaniem kolejnych cykli chemioterapii i osiągnęły wartości istotnie mniejsze po zakończeniu leczenia. Takiej zależności nie stwierdzono w grupie leczonej CTD, gdzie mediana aktywności ChT-L proteasomu nie uległa zmianie, a stężenie proteasomu zwiększyło się po leczeniu, różnica nie była statystycznie istotna.

Klinicznie ważną obserwacją jest zachowanie się aktywności ChT-L i stężenia proteasomu w zależności od uzyskania odpowiedzi leczniczej. Autorka zaobserwowała, że wśród chorych, którzy osiągnęli remisję, w grupie leczonej bortezomibem mediana aktywności ChT-L i stężenie proteasomu była istotnie mniejsza po 3 cyklu i po zakończeniu leczenia, natomiast w grupie stosującej CTD istotnie zmniejszyła się tylko aktywność ChT-L proteasomu.

Brak odpowiedzi na leczenie przyczynowe miał swoje odzwierciedlenie w badanych parametrach, które w grupie leczonej bortezomibem zwiększyły się odpowiednio o 20% i 60% po 3 miesiącach i po zakończeniu leczenia z zastosowaniem PI.

Autorka podjęła się również oceny wartości prognostycznej badanych parametrów i wykazała istotnie większe wartości aktywności ChT-L proteasomu w grupie pacjentów odpowiadających na leczenie, w porównaniu do tych, którzy nie osiągnęli remisji, niezależnie od rodzaju stosowanej terapii. Ponadto Doktorantka udowodniła, że dłuższy PFS mieli chorzy z większa niż mediana aktywnością ChT-L proteasomu w porównaniu do pozostałych chorych, niezależnie od zastosowanej terapii.

4. Redakcja pracy

Przedłożona mi do oceny rozprawa na stopień doktora nauk medycznych jest cyklem monotematycznych prac, w których w Doktorantka jest pierwszym autorem. Na cykl prac składa się jedna praca poglądowa (w języku polskim) i 2 prace oryginalne w języku angielskim). Są to:

1. Romaniuk W i wsp.: Inhibitory proteasomów w terapii onkologicznej., *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej, 2015, 69, 1443-1459,*
   IF 0769, MNiSW: 15 pkt
2. Romaniuk W i wsp: Proteasome 20S in Multiple MYeloma comparison of concentration and chymotrypsin-like activity in plasma and serum. *The Scandinavian Journal o fClinical and Laboratory Investigation, 2018, https://doi.org/10 1080/00365513.2018.1446219*, IF 1.446, MNiSW :20
3. Romaniuk W i wsp : High chymotrypsin-like activity in the plasma of patientswith newly diagnosed multiple myelomatreated with bortezomib is predictive of a better response and longer PFS. *Annals of Hematology, 2018 (in press),* IF 3.083, MNiSW 30.

Łączna punktacja prac włączonych do cyklu publikacji stanowiących rozprawę doktorską wynosi 65 pkt MNiSW, Łączny IF: 5.298.

Do cyklu publikacji Autorka zamieściła krótkie streszczenie przeprowadzonych badań, które zawiera Wstęp, Cel pracy, Materiał i Metody, Wyniki i Wnioski.

W dyskusjach zamieszczonych w opublikowanych pracach magister Wioletta Romaniuk wszechstronnie omawia wyniki swoich badań w odniesieniu do prac innych autorów zajmujących się podobnymi problemami badawczymi. Autorka wykazała się

krytycyzmem i znakomitą znajomością problemów dotyczących proteasomów i ich inhibitorów. Rozprawa doktorska mgr Wioletty Romaniuk jest naturalną konsekwencją badań prowadzonych nad proteasomami i ich inhibitorami w chorobach rozrostowych krwi i układu chłonnego. O doświadczeniach ośrodka świadczą prace dotyczące tego zagadnienia opublikowane w renomowanych czasopismach międzynarodowych takich jak Leukemia Res, Clin Biochem.

Wnioski wynikają z wykonanych badań, są w pełni uzasadnione i klinicznie ważne. Autorka cytuje prace polskich i angielskojęzycznych autorów, z uwzględnieniem najnowszego piśmiennictwa.

We wstępie przygotowanego streszczenia autorka podała nieprawidłową liczbę klonalnych plazmocytów konieczną do rozpoznania szpiczaka mnogiego - 20%, zgodnie z aktualnie obowiązującymi kryteriami IWMG wymagany odsetek klonalnych plazmocytów wynosi 10%. Wprawdzie streszczenie to, nie jest składową rozprawy doktorskiej, jednak ponieważ zostało załączone, zwróciłam uwagę na tę istotną nieprawidłowość.

Wniosek końcowy

Oceniając rozprawę doktorską mgr Wioletty Romaniuk pragnę stwierdzić, że nie mam żadnych zastrzeżeń merytorycznych odnośnie założeń, celu podjętych badań i zastosowanych metod badawczych. Uzyskane wyniki badań są interesujące, wartościowe, mogą implikować korzyści kliniczne, pozwalają na wysunięcie wniosków odpowiadających postawionym celom, wnoszą nowe informacje do wiedzy dotyczącej proteasomów, ich znaczenia rokowniczego i udziału w odpowiedzi terapeutycznej.

Przedstawiona do recenzji praca mgr Wioletty Romaniuk spełnia wszystkie wymagania stawiane rozprawom doktorskim, ma charakter poznawczy i duże implikacje kliniczne. Mam zaszczyt przedstawić Wysokiej Radzie Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku wysoce pozytywną recenzję pracy, z wnioskiem o dopuszczenie mgr Wioletty Romaniuk do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie biorąc pod uwagę:

1. Wartość merytoryczną pracy
2. Nowoczesną metodykę badań
3. Ogromny wkład pracy włożony w wykonanie wszystkich oznaczeń i staranne opracowanie rozprawy
4. Umiejętność rozwiązywania trudnych problemów naukowych i przeprowadzenia krytycznej dyskusji własnych wyników badań w odniesieniu do piśmiennictwa.

Zgłaszam wniosek o wyróżnienie pracy.

L. Zubkiewicz

Prof. dr hab. Lidia Usnarska-Zubkiewicz

Wrocław, 6. 08. 2018

Prof. dr hab. n. med. L. Usnarska-Zubkiewicz
Specjalista chorób wewnętrznych
Specjalista hematolog
Specjalista transplantolog
8474971