



UNIwersytet Medyczny IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH WE WROCLAWIU

Zakład Profilaktyki i Leczenia Chorób Nowotworowych
Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu
50-556 Wrocław, ul. Borowska 213
tel. 71 736-4045 fax 71 736 4009

Wrocław, 18.04.2021 r.

RECENZJAROZPRAWY NA STOPIEŃ DOKTORA NAUK MEDYCZNYCH I NAUK O ZDROWIU LEK. TOMASZ WASILUK

pt.: „Ocena wpływu wybranych białek należących do rodziny czynnika martwicy nowotworu na megakariopoezę u pacjentów z nadpłytkowością samoistną”

Nowotwory mieloproliferacyjne (MPN) stanowią grupę schorzeń wywodzących się z komórki macierzystej, charakteryzującą się proliferacją jednej lub wielu linii krwiotwórczej szpiku. W momencie odkrycia mutacji genu JAK2, a następnie kolejnych mutacji, które w obecnych czasach stanowią podstawę procesu diagnostycznego w MPN okazało się jasne, że nadmierne wytwarzanie komórek w szpiku ma charakter klonalny. Mimo, iż choroby należące do kręgu MPN niejednokrotnie mogą mieć nakładające się objawy kliniczne, to klasyfikacja WHO z 2016 roku jasno określa kryteria rozpoznania poszczególnych jednostek chorobowych. Nadpłytkowość samoistna (ET) stanowi ok. 30% przypadków MPN. Do niedawna leczenie cytoredukcyjne stanowiło jedyną opcję terapii w tej jednostce chorobowej. W miarę głębszego poznawania patomechanizmów leżących u podstaw choroby, możliwości leczenia ET rozszerzają się o nowe formy leczenia choćby z zastosowaniem wybiórczych inhibitorów JAK1/JAK2 (ruxolitinib). Dalsze badania skupiają się nad zgłębieniem innych nieprawidłowości i szlaków sygnałowych, wpływających na przeżycie, różnicowanie, proliferację i funkcjonowanie komórek immunohematopoetycznych. Uważa się, że receptory i ligandy należące do rodziny czynnika martwicy nowotworu (TNF), biorące udział w utrzymaniu równowagi pomiędzy stanem pro- i przeciwzapalnym, mogą także odgrywać rolę w patogenezie ET. Lek. Tomasz Wasiluk zaproponował oryginalną tematykę badań, wpisującą się w aktualne trendy badawcze nad nadpłytkowością samoistną, stąd do lektury pracy podeszłam z dużym zainteresowaniem.

Przedstawiona do recenzji rozprawa ma układ typowy dla tego typu opracowań. Liczy 122 strony maszynopisu. Treść pracy uzupełniona jest o 14 tabel i 21 starannie przygotowanych rycin. Wstęp został poprzedzony wykazem użytych w pracy skrótów. Szczegółowy Wstęp wprowadza do problematyki nowotworów mieloproliferacyjnych, ze szczególnym uwzględnieniem nadpłytkowości samoistnej: epidemiologii, patogenezы, kryteriów diagnostycznych, czynników rokowniczych i dostępnych opcji terapeutycznych. Druga część Wstępu poświęcona została białkom i receptorom z rodziny czynnika martwicy nowotworu, ze specjalnym uwzględnieniem BAFF i APRIL w nowotworach hematologicznych. Doktorant z łatwością operuje zawiłą terminologią i zna dogłębnie tematykę przedmiotu.

Jako cel pracy Doktorant obrał sobie ocenę stężenia białek BAFF i APRIL oraz cytokin prozapalnych IL-1 β i IL-6 u pacjentów z nadpłytkowością samoistną. Dodatkowo Autor zaplanował badanie wpływu białek BAFF i APRIL na limfocyty i monocyty pozyskane z krwi pacjentów z ET oraz zdolność tych komórek do sekrecji cytokin prozapalnych po stymulacji cząsteczkami BAFF i APRIL, a także wpływ białek BAFF i APRIL na proces megakariopoezy w szpiku kostnym u pacjentów z nadpłytkowością samoistną.

Rozdział poświęcony metodyce pracy przedstawia na wstępie opis grupy badanej, do której włączono 114 chorych z ET oraz kontrolnej grupy 20 ochotników. W charakterystyce uczestników badania Doktorant posługuje się parametrem średniej wieku, podczas gdy, zdaniem Recenzenta, zasadnym byłby zastosowanie mediany wieku. Rozpoznanie ET oparte było o kryteria diagnostyczne WHO z 2008 roku. Myślę, że warto byłoby przeprowadzić analizę grupy badanej pod kątem obowiązujących zrewidowanych kryteriów z 2016 roku. Na badania uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku (uchwała Nr R-I-002/461/2018).

Materiał badany stanowiła surowica krwi obwodowej oraz aspirat szpiku. Stężenia białek BAFF, APRIL, IL-1 β i IL-6 oraz receptorów sTACI i sBCMA, w surowicy i supernatancie szpiku oznaczono metodą immunoenzymatyczną ELISA. Odsetek limfocytów T i B produkujących IL-6 i IL-1 β po 24-godzinnej stymulacji w obecności BAFF i APRIL oceniono przy użyciu wielokolorowej cytometrii przepływowej. Komórki progenitorowe CD34+ ze szpiku kostnego izolowano przy użyciu sortera komórkowego, a następnie poddano stymulacji TPO w obecności lub przy braku białka fuzyjnego TACI, w celu oceny poziomu ekspresji genów kodujących APRIL i BAFF oraz ich receptorów (ilościowy PCR), stężenia białek w supernatancie oraz ilości produkowanych płytek krwi. Na podkreślenie zasługuje bogactwo warsztatu badawczego i liczba zastosowanych przez Doktoranta metod badawczych, a dodatkową wartość wnoszą badania czynnościowe.

Analiza uzyskanych wyników wykazała podwyższony poziom APRIL i BAFF w surowicy, niezależnie od obecności mutacji JAK2(V617F) i wcześniejszego wywiadu epizodów zakrzepowo-zatorowych i krwotocznych. W badaniach nadsączu szpiku zaobserwowano podwyższone stężenie APRIL i jego receptora sBCMA oraz obniżone stężenie BAFF i sTACI w grupie pacjentów ET w porównaniu do nadsączu szpiku uzyskanego od grupy kontrolnej. Udowodniono, iż białko

APRIL odgrywa istotną rolę w dojrzewaniu megakariocytów, pełniąc rolę czynnika wzrostu, niezależnie od występowania mutacji JAK2(V617F). Neutralizacja aktywności APRIL, poprzez zastosowanie białka fuzyjnego rhTACI, wiązała się natomiast ze znaczącym obniżeniem liczby płytek krwi. Proszę o wyjaśnienie, z czego wynikała różnica liczebności grup w poszczególnych badaniach (np. oznaczenia stężeń IL-6 w surowicy wykonano w grupie 20 zdrowych ochotników i 66 chorych na nadpłytkowość samoistną, a oznaczenia stężeń IL-1 β w surowicy wykonano w grupie 14 zdrowych ochotników i 61 chorych na nadpłytkowość samoistną)?

Omówienie wyników Doktorant zawarł w Dyskusji liczącej 9 stron. Umiejętna konfrontacja wyników własnych z danymi pochodzącymi z publikacji innych autorów wskazuje na znajomość literatury przedmiotu, której spis obejmuje 276 pozycji aktualnego piśmiennictwa w znaczącej części z ostatnich lat. Po zakończeniu dyskusji Doktorant formułuje cztery wnioski, które mają swoje odzwierciedlenie w wynikach i stanowią odpowiedź na założone cele pracy.

Jeśli chodzi o moje uwagi, ponad te wspomniane w tekście recenzji, są one nieliczne. Praca została przygotowana bardzo starannie, jednak Doktorant nie ustrzegł się drobnych błędów o charakterze edytorskim czy stylistycznym. Określenie nadpłytkowości samoistnej jako „nabyte zaburzenie mieloproliferacyjne” (na str. 93) nie powinno być stosowane w odniesieniu do choroby nowotworowej, którą jest ET. Istnieje pewna niekonsekwencja w pisowni JAK vs mut JAK2 (str. 82).

Powyższe nieliczne uwagi nie zmniejszają wartości merytorycznej całości rozprawy doktorskiej, która jest przykładem bardzo dobrze zaplanowanego i przeprowadzonego eksperymentu badawczego, wnoszącego nową wiedzę na temat patogenezы nadpłytkowości samoistnej. Być może postęp w zrozumieniu budowy i funkcji cząsteczek BAFF i APRIL będzie przyczynkiem do wykorzystania tych cytokin jako potencjalnego punktu uchwytu dla nowych metod terapii celowanej także w ET. Lek. Tomasz Wasiłuk dał się poznać jako samodzielny i bardzo sprawny naukowiec, a zastosowany warsztat badawczy i samodzielność Doktoranta niewątpliwie zasługuje na pochwałę.

Reasumując uważam, że przedstawiona mi do oceny praca spełnia wymogi stawiane rozprawom na stopień doktora nauk medycznych (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 ustawie z dnia 20 lipca 2018 r., Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce, art. 179. 1). Wnoszę do Senatu Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku wniosek o dopuszczenie lek. Tomasza Wasiłuka do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie z uwagi na wysoki poziom merytoryczny pracy wnioskuję o jej wyróżnienie.

Dr hab. n. med. Aleksandra Butrym, prof. UM

Zakład Profilaktyki i Leczenia Chorób Nowotworowych
Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu

Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu
ZAKŁAD PROFILAKTYKI I LECZENIA
CHOROBY NOWOTWOROWYCH
kierownik

dr hab. Aleksandra Butrym, prof. nadzw.