

dr hab. n. med. Marcin Pasiarski
Kierownik Kliniki Hematologii i Transplantacji Szpiku
Świętokrzyskiego Centrum Onkologii
w Kielcach

ŚWIĘTOKRZYSKIE CENTRUM ONKOLOGII
Klinika Hematologii i Transplantacji Szpiku
Dział Hematologii, Transplantacji Szpiku i Immunologii Klinicznej
Ośrodek Hematologii i Nowotworów Krwi
ul. Artwińskiego 3, 25-734 Kielce
(9) REGON 001263233, NIP 959 129 49 07
gab. lekarski tel. 41 36 74 847, 41 36 74 848
sekretariat tel. 41 36 74 841, fax 41 36 74 839
kody resortowe MZ: I-000000014611, V-01, VII-009, VIII-4070

**Recenzja rozprawy doktorskiej
lekarza medycyny Tomasza Wasiluka zatytułowanej:**

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

Na zlecenie: Wydziału Lekarskiego z Oddziałem Stomatologii i Oddziałem Nauczania w Języku Angielskim Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku

Promotor pracy: Dr hab. n. med. Łukasz Bołkun

Promotor pomocniczy: Dr hab. n. med. Andrzej Eljaszewicz

I. Ogólna charakterystyka pracy

Praca doktorska lek. med. Tomasza Wasiluka liczy 122 strony tekstu, na których wyróżniono następujące, klasyczne dla tego typu prac elementy, tj. spis treści, wykaz stosowanych skrótów, wstęp, cel pracy, materiał i metodyka, wyniki badań, dyskusja, wnioski, streszczenie w języku polskim i angielskim, spis tabel i rycin oraz piśmiennictwo liczące 276 pozycji – będące bardzo szczegółowym przeglądem wiedzy na temat realizowanego przez Doktoranta projektu badawczego. Budowa pracy jest typowa, nie budzi zastrzeżeń. Praca napisana jest poprawnie językowo, staranną polszczyzną, i niezwykle zrozumiale, co warto podkreślić, ponieważ rozprawę czyta się bardzo płynnie i nie zawiera ona żadnych potknięć językowych. Praca dotyczy oceny wpływu wybranych białek rodziny czynnika martwicy nowotworu na megakariopoezę u chorych z rozpoznaniem nadpłytkowości samoistnej (ET). Temat pracy oceniam jako niezwykle ciekawy i nowatorski, wpisujący się w najnowsze trendy badań nad funkcjonowaniem układu odpornościowego i jego znaczeniem w rozwoju różnych chorób. Rola białek z rodziny czynnika martwicy nowotworu zwłaszcza badanych przez Doktoranta cząsteczek APRIL i BAFF jest kluczowa w mechanizmach aktywacyjnych i wpływających na proliferację i dojrzewanie komórek układu odpornościowego: limfocytów B ale również limfocytów T i wielu innych subpopulacji układu odpornościowego. Cząsteczki te mają ogromny wpływ na przebieg procesów zapalnych w naszym organizmie, ale również wpływają pośrednio lub bezpośrednio na komórki macierzyste krwiotworzenia w tym komórki linii megakariocytarnej. Stwierdzam, iż poruszony temat jest bardzo interesujący, z punktu widzenia poznawczego, a także może mieć wpływ na wyłonienie nowych

standardów diagnostycznych w nadpłytkowości samoistnej, jak również określenia nowych celów molekularnych dla przyszłych terapii.

Doktorant wyróżnił w swoich badaniach specyficzne stany kliniczne towarzyszące nadpłytkowości samoistnej takie jak powikłania zakrzepowo zatorowe i krwotoczne oraz status mutacji genów związanych z rozwojem ET, co znalazło odzwierciedlenie w prowadzonych badaniach. Podjęty temat jest nowoczesny i stwarzający solidną podstawę do kolejnych badań na tym polu. Autor w trakcie realizacji swojego projektu wykorzystał dobre, sprawdzone metody badawcze, a także wykazał się bardzo umiejętnym ich doбором w trakcie realizacji swojego projektu. Wykazał się przy tym intuicją badawczą, tak ważną dla pracownika naukowego. Podjęty kierunek badań jest zgodny z najnowszymi trendami w eksplorowaniu funkcjonowania układu odpornościowego.

II. Ocena merytoryczna pracy

Wstęp

Autor w tym rozdziale na 44 stronach przedstawił najbardziej istotne zagadnienia związane z podjętym przez niego problemem badawczym. W sposób przejrzysty opisuje problematykę związaną z nadpłytkowością samoistną. Przedstawia aspekty związane z epidemiologią, etiopatogenezą, rozpoznaniem choroby i jej przebiegiem. Doktorant w sposób zwięzły prezentuje aktualne poglądy na etiologię choroby, mechanizmy patofizjologiczne rozwoju nadpłytkowości samoistnej, rolę zaburzeń molekularnych i cytogenetycznych w przebiegu i rokowaniu tej choroby. Prezentuje szczegółowo kryteria diagnostyczne, rokownicze oraz prezentuje skale rokownicze ET. Dokładnie charakteryzuje cząsteczki należące do rodziny TNF. Odnosi się do ich roli w procesach hematopoezy. Szczegółowo omawia rolę systemu ligandów i receptorów związanych z APRIL i BAFF. Omawia także rolę powyższych cząsteczek zarówno w funkcjonowaniu układu odporności jak i w patogenezie nowotworów układu krwiotwórczego. Przedstawia również potencjalne ukierunkowane terapie na białka APRIL i BAFF. Szczegółowo omawia rolę innych czynników nienależących do rodziny TNF, mających wpływ na megakariopoezę: m. in. trombopoetynę, a także cytokiny takie jak IL-1 β , IL-6 wraz z ich receptorami. Szczegółowo omawia również szlaki sygnałowe (m.in. JAK-STAT) związane z megakariopoezą. Przedstawia aktualne poglądy na klasyfikację ET, aktualne zalecenia terapeutyczne w zależności od grup ryzyka. Omawia także nowe perspektywy leczenia oparte o nowe cząsteczki (Givinostat, Pracinostat itp.) a także zwraca uwagę na potencjalną możliwość wykorzystania terapii ukierunkowanej na BAFF i APRIL (np. Atacicept, Belimumab). Rozważania zawarte we wstępie są bardzo dobrze wkomponowane w funkcjonowanie układu odporności i wzajemnych relacji między układem krwiotwórczym, a właśnie układem odporności. Przedstawiając powyższe bardzo dobrze

dobiera najnowszą literaturę. Można stwierdzić, że wstęp jest napisany w sposób bardzo czytelny i klarowny i stanowi swoiste kompendium wiedzy na temat nadpłytkowości samoistnej jak i roli wybranych elementów układu odporności – cząsteczek z rodziny białek TNF, ale także innych cytokin prozapalnych na przebieg tej choroby. Warto również podkreślić wysoką jakość prezentowanych rycin pomagających w zrozumieniu patomechanizmów ET.

Cel pracy

Cele pracy zostały przedstawione jasno i precyzyjnie. Zostały one wypunktowane jako:

1. Ocena stężenia białek BAFF i APRIL u chorych z ET we krwi i nadsączu szpiku,
2. Ocena stężenia cytokin prozapalnych IL-1 β i IL-6,
3. Bezpośredni wpływ BAFF i APRIL na limfocyty i monocyty pozyskane z krwi chorych na ET oraz zdolność tych komórek do sekrecji cytokin prozapalnych po stymulacji cząsteczkami BAFF i APRIL,
4. Bezpośredni wpływ białek BAFF i APRIL na proces megakariopoezy w szpiku kostnym u chorych z ET

Materiał i Metody

Rozdział ten jest przedstawiony poprawnie i odpowiednio do prowadzonych przez Doktoranta badań. Zawiera wszelkie niezbędne informacje. Autor dokładnie charakteryzuje badane populacje; zarówno chorych na ET (wraz ze stratyfikacją pod względem przynależności do grup ryzyka), jak też grupę kontrolną. Warto podkreślić, że w grupie kontrolnej znalazły się zdrowe osoby które wyraziły zgodę na pobranie szpiku specjalnie do tego badania – to niezwykle rzadkie postępowanie w obecnie prowadzonych badaniach naukowych i świadczy o dużym zaangażowaniu doktoranta w prowadzone badania oraz niezwykle zdolność przekonywania – bardzo podnosi to wartość pracy. Starannie opisane są zastosowane metody badawcze: ocena stężenia białek BAFF, APRIL, IL-1 β , IL-6, cytometria przepływowa, metody immunoenzymatyczne, PCR, sposób prowadzenia hodowli komórkowych, analiza statystyczna. Sposób zaplanowania i wykonania doświadczeń świadczy o bardzo dobrym warsztacie badawczym Doktoranta. Na przeprowadzenie wszystkich badań Doktorant uzyskał zgodę Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku.

Wyniki

Rozdział ten jest bardzo szczegółowy i posiada charakter opisowy. Prawie każdy oceniany parametr jest przedstawiony w postaci rycin lub tabel, co bardzo ułatwia śledzenie tekstu i sposobu realizacji badań. Wszystkie ryciny i tabele zostały przygotowane starannie, a ich analiza nie nastręcza żadnych trudności. Doktorant w tym rozdziale prezentuje oznaczenie stężeń APRIL w surowicy osób zdrowych oraz chorych na ET, przy czym porównuje również stężenia APRIL w grupie chorych z lub bez mutacji JAK2(V617F). Wykazał istotnie statystycznie wyższe stężenie cząsteczki APRIL u chorych na ET w stosunku do grupy kontrolnej, jednak bez istotnych różnic w obrębie populacji samych chorych w podziale na osoby z mutacją JAK2 (V617F) jak bez jej obecności. Następnie Doktorant podobnie ocenił stężenie cząsteczki BAFF w grupie chorych na ET i grupie kontrolnej. Tu również stężenie BAFF było znamienne statystycznie wyższe w grupie chorych w stosunku do grupy kontrolnej. Nie wykazano natomiast różnic stężenia BAFF w obrębie populacji samych chorych w podziale na osoby z mutacją JAK2 (V617F) jak bez jej obecności. Dodatkowo Autor przeprowadził badania nad surowiczym stężeniem BAFF i APRIL wśród chorych na ET w podziale na grupy z incydentami powikłań zakrzepowozatorowych i bez nich. Nie wykazał tu jednak różnic istotnych statystycznie. Kolejnym wykonanym badaniem przez Doktoranta była ocena stężeń BAFF i APRIL w nadsączu szpiku w grupie badanej chorych z ET i w grupie kontrolnej. Badanie to wykazało istotnie statystycznie wyższe stężenie zarówno BAFF jak i APRIL w grupie chorych na ET. Nie wykazały one różnic stężeń w obrębie populacji samych chorych w podziale na osoby z mutacją JAK2 (V617F) jak bez jej obecności. W kolejnych badaniach Doktorant bada różnice stężeń rozpuszczalnej formy receptora BCMA i TACI w nadsączu szpiku u osób z ET i w grupie kontrolnej wykazując istotnie statystycznie wyższe stężenie sBCMA w grupie chorych w stosunku do grupy kontrolnej. Różnicy takiej nie wykazał natomiast w przypadku sTACI. Następnym badaniem było porównanie stężeń IL-1 β i IL-6 w surowicy grupy kontrolnej oraz chorych na ET. Stężenie IL-1 β nie różniło się istotnie między badanymi grupami, natomiast stężenie IL-6 było istotnie statystycznie wyższe w grupie chorych na ET JAK2(V617F)+ w stosunku do grupy kontrolnej i nie wykazano takiej różnicy w przypadku chorych na ET z JAK2(V617F)-. Kolejnym niezwykle ciekawym porównaniem było zestawienie stężeń IL-1 β i IL-6 w surowicy osób chorych na ET z epizodami VTE i w grupie kontrolnej. Stężenia IL-1 β nie różniły się istotnie pomiędzy badanymi grupami. Natomiast stężenie IL-6 było istotnie statystycznie wyższe w grupie chorych na ET z epizodami VTE w porównaniu do grupy kontrolnej dotyczyło to zwłaszcza chorych z obecnością mutacji JAK2(V617F)+. Następnie Doktorant porównał ocenę ekspresji APRIL i BAFF na komórkach linii megakariocytowej uzyskanych podczas hodowli komórkowej i stwierdził istotnie statystycznie wyższy poziom ekspresji APRIL w 7 dniu hodowli komórkowej w grupie chorych na ET z obecnością mutacji JAK2(V617F) w stosunku do grupy chorych bez tej mutacji, podobną zależność Doktorant wykazał w stosunku do cząsteczki BAFF.

Ciekawą obserwacją było również stwierdzenie istotnie statystycznie niższego poziomu płytek krwi w 13 dobie hodowli komórek megakariocytów w środowisku TPO+rhTACI-Fc w stosunku do hodowli poddanej izolowanej stymulacji TPO. Doktorant oceniał również wpływ 24-godzinnej hodowli PBMC chorych z ET w obecności BAFF/APRIL na poziomy IL-1 β i IL-6 w obrębie limfocytów CD19+ oraz limfocytów CD4+ - nie wykazał jednak istotnego wpływu takiej hodowli na badane populacje limfocytów, choć zaznaczyła się pewna tendencja (nie spełniająca jednak warunków istotności statystycznej) związana ze wzrostem limfocytów CD4+ z obecnością IL-1 β w hodowli z obecnością BAFF u chorych z ET JAK2(V617F)-. Doktorant wykazał również szereg dodatnich istotnie statystycznych korelacji pomiędzy stężeniem BAFF i APRIL a wybranymi parametrami laboratoryjnymi co świadczy o ich istotnym wpływie na status choroby oraz związek z obecnością lub brakiem mutacji w obrębie JAK2(V617F).

Wszystkie te badania są niezwykle interesujące i rzucają nowe światło na biologię ET. Recenzent ma nadzieję na szybkie opublikowanie tych obserwacji.

Dyskusja

Rozdział ten ma swoistą budowę dla tego typu opracowań, co uważam za przejaw dojrzałości naukowej Doktoranta. Doktorant w przekonujący sposób łączy dane literaturowe z komentarzem uzyskanych przez siebie wyników badań. Precyzyjnie wyjaśnia powód, dla którego istotny jest wybrany przez niego temat badawczy, a mianowicie wpływ białek APRIL i BAFF na patogenezę chorób mieloproliferacyjnych, szczególnie zaś nadpłytkowości samoistnej – zwłaszcza w kontekście ich istotnej roli w limfoproliferacjach oraz faktu, że w patogenezie wielu chorób nowotworowych, nie tylko hematologicznych, niezwykle istotna jest rola procesów zapalnych. Doktorant w swojej pracy potwierdził znane już wcześniej wyższe stężenie BAFF u osób z ET niezależnie od statusu mutacji JAK2(V617F) jednak dodatkowo przeprowadził równoczesne badanie stężenia APRIL co do tej pory nie było znane z dostępnych publikacji. Co więcej ustalił, że stężenie to w tej grupie chorych jest znacznie wyższe niż w przebiegu chorób limfoproliferacyjnych – to niezwykle ciekawa obserwacja. Stwierdził w swoich badaniach również związek pomiędzy wyższym stężeniem APRIL a wyższym poziomem płytek krwi i leukocytów we krwi obwodowej (tych ostatnich u chorych z JAK2(V617F)+). Fakt ten może pozycjonować badanie stężenia APRIL jako nowego parametru o znaczeniu rokowniczym. W dyskusji Doktorant podkreśla znaczenie procesów zapalnych na przebieg ET zwłaszcza jej powikłań pod postacią epizodów zakrzepowo – zatorowych (VTE). W swoich badaniach poszukiwał związku między stężeniem BAFF, APRIL, IL-1 β , IL-6 a stwierdzaną częstością VTE. W swoich badaniach nie wykazał takiego związku pomiędzy stężeniem BAFF i APRIL a epizodami VTE mimo doniesień literaturowych potwierdzających taką zależność. Tłumaczy to tym, że w badanej przez niego grupie wystąpiła stosunkowo mała częstość

epizodów VTE oraz faktem, że w dużych badaniach opisanych w literaturze większość chorych z dodatnim wywiadem epizodów VTE miała dodatni status mutacji JAK2(V617F). Jest to logiczne wytłumaczenie, ale jednocześnie skłania do refleksji, że wciąż mało wiemy o tych związkach i być może nie są one aż tak bezpośrednie jak mogłoby się wydawać. Recenzent zachęca Doktoranta do pogłębienia badań na ten temat, będąc jednocześnie pod wrażeniem opisu negatywnego wyniku badania – to cecha, która nieczęsto się zdarza w publikacjach w których większość badaczy chce wykazać jakiś związek a przecież każdy wynik pozytywny czy negatywny wnosi ogromnie dużo do naszej wiedzy. Ta cecha naukowca jest niezwykle cenna u Doktoranta. W dalszej części dyskusji Doktorant komentuje trafnie zależność pomiędzy epizodami VTE a stężeniem IL-6 oraz jej związkiem z nadprodukcją TPO. Trafnie zauważa również że związek pomiędzy epizodami VTE stężeniem APRIL i BAFF, pobudzeniem limfocytów oraz stężeniem IL-1 β , IL-6 i procesem zapalnym nie jest prosty a jest raczej złożoną niebezpośrednią kaskadą procesów wzajemnie na siebie wpływających. Udokumentował ten fakt złożoności wzajemnych relacji pomiędzy wymienionymi cząsteczkami, komórkami i procesami, kontynuując swoje badania w których oceniał wpływ BAFF i APRIL na produkcję IL-1 β i IL-6. Autor przyznaje, że nie udało mu się wykazać wpływu BAFF i APRIL na syntezę cytokin prozapalnych w limfocytach zarówno CD19+ jak i CD4+. Dane literaturowe na ten temat są skąpe i niejednoznaczne, a próba ustalenia takiego związku jest trudnym zadaniem stąd też uważam, że choćby z tego powodu należą się Doktorantowi wyrazy uznania za próbę rozwikłania tych wzajemnych relacji. I jak sam Doktorant zauważa dlatego nadal jest to pole dla dalszych badań i do których zachęca go również Recenzent. W toku dalszych badań oceniających stężenie BAFF i APRIL w nadsączu szpiku osób chorych na ET, które Doktorant szczegółowo omawia w „Dyskusji” i porównuje je do danych literaturowych, potwierdził istotną rolę BAFF i APRIL w patogenezie nadpłytkowości samoistnej. W ostatnim etapie badań Doktorant postanowił potwierdzić znaczenie APRIL w megakariopoezie u chorych z rozpoznaniem ET. Stymulował pozyskane z aspiratu szpiku kostnego komórki CD34+ egzogenną TPO, następnie poddawał je hodowli w obecności rhTACI-Fc, które miało za zadanie wiązać APRIL. Doktorant zaobserwował, iż neutralizacja APRIL znacząco zmniejszała potencjał proliferacyjny megakariocytów, podczas gdy hodowla megakariocytów bez obecności rhTACI-Fc wiązała się ze znaczącym wzrostem liczby płytek krwi. Efekt ten nie był związany ze statusem mutacji JAK2(V617F). Co ciekawe Doktorant nie wykazał obecności receptorów TACI i BCMA na komórkach linii megakariocytarnej. Autor wysnuwa stąd wniosek, że być może to świadczy o sposobie przekazywania sygnału przez nieznane jeszcze receptory z czym Recenzent się również zgadza.

Obserwacje dotyczące cząsteczek BAFF i APRIL w patogenezie nadpłytkowości samoistnej poczynione przez Doktoranta stanowią niezwykle interesujący i skłaniający do dalszych badań materiał poznawczy. Należy też szczególnie pochwalić Doktoranta za niezwykle trafnie wyciągane wnioski i

umiejętne dostosowywanie kolejnych badań w stosunku do uzyskiwanych wyników. To niezwykle ważna cecha naukowca.

Wnioski

Wnioski w postaci 4 punktów odpowiadają na postawione cele. Doktorant stwierdził:

1. APRIL i BAFF odgrywają istotną rolę w rozwoju nadpłytkowości samistnej, jednak nie jest ona bezpośrednio związana z obecnością mutacji JAK2(V617F)
2. Wysokie ryzyko nadkrzepliwości w grupie chorych z mutacją JAK2(V617F) związane jest z podwyższonym stężeniem IL-6 w surowicy
3. APRIL, ale nie BAFF odgrywa istotną rolę w dojrzewaniu megakariocytów, pełniąc rolę czynnika wzrostu, niezależnie od występowania czynników genetycznych
4. Blokowanie aktywności APRIL poprzez zastosowanie białka fuzyjnego ogranicza megakariopoezę, przyczyniając się do znacznego obniżenia liczby płytek krwi

Te wnioski stanowią ważny wkład Doktoranta w zrozumienie mechanizmów immunologicznych zaangażowanych w przebieg nadpłytkowości samoistnej i mogą stanowić punkt wyjścia dla dalszych badań naukowych nad tą chorobą.

Streszczenie w języku polskim i angielskim

Rozdziały te są przedstawione bardzo dobrze i oddają w pełni zawartość pracy. Będą niewątpliwie przydatne na potrzeby przyszłych publikacji.

Bibliografia

Piśmiennictwo składa się z 276 pozycji, głównie anglojęzycznych i w zakresie ilości i swoistości są dobrze dobrane.

III. Ocena końcowa pracy

Praca doktorska lek. Tomasza Wasiluka pt. "Ocena wpływu wybranych białek należących do rodziny czynnika martwicy nowotworu na megakariopoezę u pacjentów z nadpłytkowością samoistną" jest opracowaniem oryginalnym i wnosi nowe fakty do wiedzy na temat patogenezy nadpłytkowości samoistnej. Badania są nowatorskie i stanowią cenne źródło informacji na temat biologii tej choroby. Podkreślam, że założenia i cel pracy zostały w pełni zrealizowane, a wnioski są spójne i swoiste. Stąd zwracam się do Senatu Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku o dopuszczenie lek. Tomasza Wasiluka do dalszych etapów przewodu doktorskiego oraz nagrodzenie pracy.

Kielce, dn. 27.03.2021r.

dr hab. n. med. Marcin Pasiarski