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
lek Małgorzata Banaszkiewicz

pt "Assessment of ferric management in multiple myeloma in relationship to stage of kidney failure".

Ocena gospodarki żelazowej w szpiczaku mnogim w zależności od stopnia uszkodzenia nerek".

Zgodnie z uchwałą Rady Dyscypliny Nauki medyczne Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie z dn 17 maja 2022r 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 występowanie niedokrwistości u chorych na szpiczaka plazmocytowego (Multiple Myeloma, MM). Mechanizm prowadzący do rozwoju niedokrwistości u chorych na szpiczaka jest złożony i wielopłaszczyznowy. Zależnie od rozległości nacieczenia szpiku przez klonalne komórki plazmatyczne, ulega zaburzeniu jego funkcja. Najwcześniej i najczęściej upośledzona jest erytropoeza, zaburzenia granulopoezy i trombocytopoezy występują zwykle w zaawansowanych stadiach choroby. Erytroblasty ulegają również przyspieszonej apoptozie w wyniku działania TNF alfa i Il-1, co pogłębia niedokrwistość. Upośledzeniu erytropoezy sprzyja nieadekwatne do stopnia niedokrwistości wydzielanie erytropoetyny (Epo), co wynika m.in. z uszkodzenia funkcji nerek spowodowanego homogenną populacją łańcuchów lekkich immunoglobulin κ lub λ, wykazujących różną nefrotoksyczność. Do wystąpienia i pogłębienia niedokrwistości może przyczyniać się niedobór Fe, dlatego u wszystkich chorych na MM zaleca się badanie gospodarki żelazowej. W rozwoju niedokrwistości nie można pominąć również udziału cytokin wytwarzanych przez złośliwe plazmocyty i układ

immunologiczny gospodarza, co oznacza, że spełnia ona kryteria niedokrwistości chorób przewlekłych (ACD, anemia of chronic disease).

Objawy niedokrwistości w postaci postępującego osłabienia, zmęczenia, bladości, tachykardii stwierdza się u około 70% chorych ze świeżo rozpoznaną chorobą i u prawie wszystkich pacjentów ze szpiczakiem opornym lub nawrotowym.

Głównym celem przedstawionej mi do recenzji pracy, była ocena zastosowania nowych biomarkerów gospodarki żelazowej w tym GDF 15 (Growth Differentiation Factor 15, zróżnicowany czynnik wzrostu 15), sTfR (soluble transferrin receptor, rozpuszczalny receptor transferryny) i hepcydyny 25, u chorych na szpiczaka plazmocytowego w zależności od stopnia uszkodzenia nerek. Doktorantka otrzymała za zadanie analizę związku pomiędzy stopniem zaawansowania szpiczaka i niedokrwistością a wybranymi parametrami gospodarki żelazowej, zbadanie korelacji pomiędzy tymi parametrami a stopniem uszkodzenia nerek i śmiertelnością chorych na MM.

Problemy i pytania postawione przez Doktorantkę są klinicznie bardzo ważne, naukowo, u chorych na MM, w tak szerokim zakresie badań niedostatecznie opracowane.

2. Poprawność metodyczna

Doktorantka przeprowadziła 2 badania. Pierwsze dotyczyło oceny zależności pomiędzy stężeniem GDF 15 a występowaniem niedokrwistości i uszkodzeniem nerek w grupie chorych na szpiczaka plazmocytowego i szpiczaka tlącego się, Celem drugiego badania była ocena stężenia sTfR i hepcydyny 25 u chorych na szpiczaka w zależności od występowania niedokrwistości i dysfunkcji nerek. Badaniem (w obu analizach) objęto 73 pacjentów: 35 kobiet i 38 mężczyzn w wieku 29-90 lat, w tej grupie u 6 osób rozpoznano szpiczaka tlącego się. W badanej kohorcie 6 pacjentów przed włączeniem do badania przebyło ostrą niewydolność nerek, w czasie pobierania materiału do analizy GFR<60 stwierdzono u 26 pacjentów. U 14 chorych (19%) stężenie hemoglobiny było poniżej dolnej granicy normy. Chorzy w większości byli w trakcie terapii przyczynowej, 8 chorych w czasie włączenia do badania, nie rozpoczęło leczenia przyczynowego.

21 osób zdrowych, 13 kobiet i 8 mężczyzn w wieku 39-66 lat stanowiło grupę kontrolną.

Wszyscy pacjenci byli diagnozowani i leczeni, w okresie od VIII 2016r do X 2017r, w Szpitalu Uniwersyteckim w Krakowie i wyrazili zgodę na udział w badaniu. Na przeprowadzenie badań Autorka uzyskała zgodę Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Jagiellońskiego.

Obok standardowo stosowanych parametrów oceniających gospodarkę żelazową takich jak stężenie w surowicy żelaza, ferrytyny i transferryny, Doktorantka zbadała również stężenie sTfR, GDF 15 oraz hepcydyny 25. Ponadto badano parametry stanu zapalnego w tym stężenie białka C- reaktywnego (CRP) i interleukiny-6 (Il 6) oraz N-końcowego peptydu natiuretycznego typu proB (NT proBNP). Aktywność szpiczaka została oceniona w oparciu o standardowe parametry, a funkcja nerek na podstawie stężenia kreatyniny, GFR oraz cystatyny C i lipokaliny związanej z żelatynazą neutrofilów (NGAL) w surowicy i moczu. Badania nowych markerów gospodarki żelazowej przeprowadzono metodą ELISA, używając właściwych zestawów handlowych.

Dobór i liczebność grupy badanej i kontrolnej jest satysfakcjonujący i pozwala na przeprowadzenie wiarygodnej analizy statystycznej. Zwraca jednak uwagę fakt, że badana grupa była heterogenna, obejmująca chorych na szpiczaka tlącego się. Chorzy na szpiczaka tlącego się, z definicji nie mają niedokrwistości i dysfunkcji nerek, jak również nie wymagają leczenia przyczynowego (z wyjątkiem badań klinicznych).

Zastosowane metody oceny parametrów gospodarki żelazowej są nowoczesne, prawidłowo zaprojektowane i obejmują swym zakresem postawione przez Doktorantkę cele pracy. 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 wykazała, że stężenie GDF15 i IL-6 jest istotnie większe u chorych na szpiczaka w porównaniu z grupą kontrolną, podobnie stężenie NGAL w moczu było większe niż w grupie kontrolnej, a różnica była bliska istotności. Autorka udowodniła, że u chorych na MM stężenie GDF 15 w surowicy wykazywało dodatnią korelację z wykładnikami aktywności szpiczaka m.in. ze stężeniem wolnych łańcuchów lekkich kappa i lambda, stężeniem beta 2 mikroglobuliny, oraz ujemną korelację ze stężeniem albuminy. Doktorantka wykazała ponadto, że stężenie GDF 15 było istotnie większe u chorych na szpiczaka z niedokrwistością i wykazywało ujemną korelację ze stężeniem hemoglobiny. Badania wykazały, że GDF15 koreluje dodatnio z markerami filtracji kłębuszkowej (stężeniem kreatyniny i cystatyny C) jak również z markerami uszkodzenia kanalików nerkowych (stężeniem NGAL w moczu i cystatyny C w moczu), Stężenie GDF 15

nie wpływało istotnie na całkowity czas przeżycia u chorych na szpiczaka. Uzyskane wyniki mogą być autorskim osiągnięciem Doktorantki

Autorka wykazała, że stężenie sTfR w surowicy było istotnie większe, a stężenie hepcydyny 25 nie różniło się pomiędzy grupą szpiczaków a grupą kontrolną. Na uwagę zasługuje fakt, że zarówno stężenie sTfR jak i hepcydyny korelowało z odpowiedzią na leczenie, ponadto interesującym autorskim spostrzeżeniem Doktorantki było wykazanie, że stężenie hepcydyny 25 w surowicy było istotnie większe u chorych leczonych bortezomibem, lenalidomidem i sterydami.

Autorka dowiodła, że stężenie sTfR i hepcydyny 25 w surowicy było większe w grupie szpiczaków z niedokrwistością w porównaniu do chorych z prawidłowym stężeniem hemoglobiny, ponadto stężenie hepcydyny 25 wykazywało ujemną korelację ze stężeniem hemoglobiny. Nie wykazano korelacji pomiędzy sTfR i hepcydyną 25 a markerami czynności nerek.

Klinicznie ważną jest informacja uzyskana w grupie chorych na szpiczaka po 27 miesiącach od rozpoczęcia badania, że wyjściowe stężenie hepcydyny 25 było istotnym predykatorem przeżycia w analizowanej grupie szpiczaków.

4. Redakcja pracy

Przedłożona mi do oceny rozprawa na stopień doktora nauk medycznych składa się z cyklu 3 monotematycznych prac, w których w Doktorantka jest pierwszym autorem. Na cykl prac składa się jedna praca poglądowa i 2 prace oryginalne (w języku angielskim). Są to:

1. **Małgorzata Banaszkiewicz**, Jolanta Małyszko, David H. Vesole, Karolina Woziwodzka, Artur Jurczyszyn, Marcin Żórawski, Marcin Krzanowski, Jacek Małyszko, Krzysztof Batko, Marek Kuźniewski, Katarzyna Krzanowska. New Biomarkers of Ferric Management in Multiple Myeloma and Kidney Disease-Associated Anemia. *Journal of Clinical Medicine,* 2019. IF - 3,303; MNiSW/MEiN - 140;
2. **Małgorzata Banaszkiewicz**, Jolanta Małyszko, David H. Vesole, Karolina Woziwodzka, Artur Jurczyszyn, Marcin Żórawski, Marcin Krzanowski, Jacek Małyszko, Krzysztof Batko, Marek Kuźniewski, Katarzyna Krzanowska. New Biomarkers of Ferric Management in Multiple Myeloma and Kidney Disease-Associated Anemia. *Journal of Clinical Medicine,* 2019. IF – 4,711; MNiSW/MEiN - 100;

3. **Małgorzata Banaszkiewicz**, Jolanta Małyszko, Krzysztof Batko, Ewa Koc-Żórawska, Marcin Żórawski, Paulina Dumnicka, Artur Jurczyszyn, Karolina Woziwodzka, Aleksandra Maleszka, Marcin Krzanowski, Andrzej Kraśniak, Ryszard Drożdż, Katarzyna Krzanowska. The Key Role of Hepcidin-25 in Anemia in Multiple Myeloma Patients with Renal Impairment. *Medicina,* 2022. IF – 2,430; MEiN - 40.

Łączna punktacja prac włączonych do cyklu publikacji stanowiących rozprawę doktorską wynosi 280 pkt MNiSW, łączny IF:10,444.

Do cyklu publikacji Autorka dołączyła omówienie swojego osiągnięcia naukowego.

Omówienie nie jest częścią rozprawy doktorskiej, niemniej zostało połączone z osiągnięciem naukowym, dlatego wymaga kilku uwag. Omówienie zostało w mojej opinii sztucznie podzielone, poprzez zamieszczenie publikacji stanowiących właściwą rozprawę doktorską jako jego Rozdział 7, pomiędzy Rozdziałem 6 „ Limitacje badania" a Rozdziałem 8 „Streszczenia artykułów". W opinii recenzenta w pierwszej kolejności winny być zamieszczone artykuły stanowiące osiągniecie naukowe, a następnie omówienie, zawierające Wstęp, Założenia i Cel pracy, Materiał i Metody, Limitacje badania. Streszczenia artykułów, Wnioski.

We wstępie omówienia Doktorantka przedstawiła m.in. uzasadnienie połączenia w/w prac w cykl publikacji. Autorka słusznie podkreśliła, że istnieje niewiele prac dotyczących niedokrwistości u chorych na szpiczaka plazmocytowego, uwzględniających nowe markery gospodarki żelazowej.

Określenie „Limitacje", które zostało użyte w omówieniu, jest „kalką" określenia angielskiego, należałoby raczej użyć polskiego słowa „ograniczenia".

W zamieszczonych w omówieniu streszczeniach artykułów (Rozdział 8.2 i 8.3) Autorka umieściła podrozdziały "Wnioski z przeprowadzonych badań". Są to jednolite teksty, omawiające uzyskane wyniki, które nie mają charakteru wniosków.

Wnioski zostały umieszczone w pkt 9 omówienia, wynikają z wykonanych badań, są w pełni uzasadnione i klinicznie ważne. W mojej ocenie te wnioski winny być zamieszczone w pracach oryginalnych wchodzących w skład cyklu, nie tylko w omówieniu osiągnięcia naukowego.

Autorka cytuje prace angielskojęzycznych autorów, z uwzględnieniem najnowszego piśmiennictwa.

Doktorantka załączyła oświadczenia współautorów o ich udziale w przedstawionych pracach.

Wniosek końcowy

Oceniając rozprawę doktorską lek. Małgorzaty Banaszkiewicz 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 nowych markerów gospodarki żelazowej i ich znaczenia rokowniczego.

Przedstawiona do recenzji praca lek. Małgorzaty Banaszkiewicz spełnia wszystkie wymagania stawiane rozprawom doktorskim, ma charakter poznawczy i duże implikacje kliniczne. Mam zaszczyt przedstawić Radzie Dyscypliny Nauki Medyczne UJ w Krakowie wysoce pozytywną recenzję pracy, z wnioskiem o dopuszczenie lek. Małgorzaty Banaszkiewicz 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. Spełnienie warunków rekomendowanych przez Radę Dyscypliny Nauki medyczne UJ dotyczących wyróżnienia rozprawy w formie cyklu prac

Zgłaszam wniosek o wyróżnienie pracy.

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

Prof. dr hab. Lidia Usnarska-Zubkiewicz

Wrocław, 8. 08. 2022