



Katedra i Klinika Hematoonkologii i Transplantacji Szpiku
Uniwersytet Medyczny w Lublinie
Department of Haematooncology and Bone Marrow Transplantation
Medical University of Lublin
Kierownik: prof. dr hab. med. Marek Hus
ul. Staszica 11, 20-081 Lublin

Lublin, 19.02.2024 r.

Prof. dr hab. n. med. Marek Hus
Uniwersytet Medyczny w Lublinie
Klinika Hematoonkologii i Transplantacji Szpiku

Ocena rozprawy doktorskiej **lek.med. Piotra Kuliga** pt. „Epigenetyczne aspekty mechanizmu działania bortezomibu, mechanizmów rozwoju lekooporności oraz implikacje kliniczne dla rozwoju potencjalnych terapii adjuwantowych”. wykonanej pod kierunkiem dr hab. n. med. Bartłomieja Baumert.

Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska dotyczy ważnego problemu klinicznego jakim jest dysfunkcja mikrośrodowiska szpiczaka plazmocytoowego (MM) na skutek dysregulacji procesów epigenetycznych odpowiedzialnych za ekspresję kluczowych zjawisk przekazywania informacji genetycznej, niezależnej od zmian w sekwencji nukleotydów w krytycznych dla równowagi molekularnej genów. W ciągu ostatnich 20 lat zachorowalność na nowotwory hematologiczne istotnie wzrosła. Liczba nowo rozpoznanych nowotworów krwi u dorosłych i dzieci w Polsce wynosi ok. 9 tys. rocznie, co stanowi ok. 5,5% wszystkich nowotworów złośliwych w kraju. Grupa osób, u których rozpoznaje się te nowotwory jest bardzo szeroka, a ryzyko zachorowania wyraźnie zwiększa się powyżej 65. roku życia. Jednak w ostatnich latach coraz częściej diagnoza jest

stawiana u młodszych pacjentów. Około połowa z nich jest nadal aktywna zawodowo. Rozpoznanie choroby oraz podjęcie leczenia pozwalają na zachowanie sprawności, która bezpośrednio przekłada się na jakość życia pacjentów.

Szpiczak plazmocytowy (SzP) jest drugim co do częstości występowania najczęstszym nowotworem złośliwym układu krwiotwórczego, odpowiedzialnym za ponad 100 000 zgonów na całym świecie. Patogeneza SzP jest procesem bardzo złożonym i wciąż nie do końca poznany. Od kilku lat obserwujemy pozytywne zmiany w dostępie polskich pacjentów hematologicznych do optymalnych terapii. Wprowadzono wiele leków celowanych, ukierunkowanych na komórki nowotworowe albo angażujących układ immunologiczny do skutecznej walki z chorobą. Nowe leki pozwoliły na skuteczną kontrolę chorób hematologicznych, które coraz częściej zyskują miano chorób przewlekłych. Szeroki wachlarz dostępnych terapii z jednej strony stanowi wyzwanie dla systemu ochrony zdrowia, z drugiej rodzi wiele dylematów klinicznych dla lekarza hematologa min. jak najlepiej dobrać odpowiedni lek dla konkretnego chorego. Istnieje niewątpliwa konieczność rozwoju terapii personalizowanych oraz poszukiwanie czynników ryzyka mechanizmów lekooporności oraz niekorzystnego przebiegu nowotworów hematologicznych z identyfikacją markerów molekularnych pozwalających na lepsze zrozumienie molekularnej onkogenezy i genetyki nowotworów krwi.

Obecnie szpiczaka plazmocytozowego nie można wyleczyć, chociaż kliniczne zastosowanie leków immunomodulujących (IMiD), inhibitorów proteasomu, przeciwciał ukierunkowanych na antygen CD38, BCMA a także autologiczna transplantacja komórek macierzystych (auto-SCT) znacznie wydłużyły czas życia chorych. W ostatnich latach wprowadzenie do terapii przeciwciał bispecyficznych a w szczególności terapii CART-wykorzystujących zmodyfikowane (chimeryczne) limfocyty T zaprogramowane w ten sposób, żeby przekierować ich naturalne działanie immunologiczne na aktywność antynowotworową, poprawiło spektakularnie rokowanie w opornych na leczenie postaciach szpiczaka. Ponadto, wieloletnia obserwacja chorych ze szpiczakiem, po alloprzeszczepie komórek krwiotwórczych (alloSCT) dostarcza mocnych dowodów na istnienie efektu przeszczep przeciwko szpiczakowi, co może poprawić wyniki i zapewnić możliwość wyleczenia podgrupy pacjentów z nowo zdiagnozowanym szpiczakiem plazmocytozowym po alloSCT.

Rozprawa doktorska lek. Med. Piotra Kuliga oparta jest na wynikach badań, spójnego tematycznie zbioru składającego się z trzech oryginalnych prac naukowych, w tym jednej pracy poglądowej, opublikowanych w recenzowanych czasopismach naukowych.

Celem pracy było zbadanie potencjalnych aspektów wpływu inhibitorów proteasomu na mechanizmów epigenetycznych w komórkach szpiczaka plazmocytozy, zdefiniowanie zależnych od tych mechanizmów procesów lekooporności oraz określenie potencjalnych mechanizmów poprawiających efektywność terapeutyczną tej grupy leków.

Rozprawę otwiera artykuł pt. "Epigenetic Alterations as Vital Aspects of Bortezomib Molecular Action" – opublikowany w 2023 roku w czasopiśmie *Cancers* (IF- 5,2). Jest to praca poglądowa, która prezentuje aktualny stan wiedzy na temat molekularnej roli bortezomibu w procesach epigenetycznych, potencjalnie odpowiedzialnych za modyfikację metylacji DNA, metylacji i acetylacji histonów, procesy „splicingu” RNA, transkrypcji i translacji oraz remodelingu chromatyny w komórkach plazmatycznych. W publikacji Autor uwzględnił niemal wszystkie dostępne w 2023 roku publikacje traktujące o epigenetycznych aspektach działania BTZ, mechanizmach kreujących oporność na BTZ oraz kluczowych sposobach jej przezwyciężania. Selekcja artykułów została przeprowadzona przez przeszukanie dostępnych baz naukowych min. PubMed, Scopus, Web of Science, Google Scholar.

Kolejna publikacja pt. „ 5-Aza-2'-Deoxycytidine Alters the Methylation Profile of Bortezomib-Resistant U266 Multiple Myeloma Cells and Affects Their Proliferative Potential „ w *International Journal of Molecular Sciences* (IF-5,6) jest pracą doświadczalną. Do eksperymentu wykorzystano komórki MM linii U266, które w określony sposób inkubowane były z BTZ oraz azacytydyna (AZA). W trakcie eksperymentu izolowano DNA komórek plazmatycznych linii U266 oraz wykonano analizę profilu metylacji. Wyniki zebrano i opracowano z wykorzystaniem stosownych programów statystycznych. Autor min. ocenił potencjał proliferacyjny komórek MM linii U266. Dokonał analizy profilu stopnia metylacji w określonych punktach czasowych pasażowanych komórek z BTZ i inhibitorem metylacji. Jednocześnie wykonał analizę GSEA (Gene Set Enrichment Analysis) identyfikując ponad 20 istotnych statystycznie procesów

ukazujących geny z obniżonym poziomem metylacji w komórkach inkubowanych z BTZ i inhibitorem BTZ w porównaniu do komórek traktowanych samym BTZ. Trzecią pracą cyklu jest artykuł pt. „Vitamin D and K Supplementation Is Associated with Changes in the Methylation Profile of U266-Multiple Myeloma Cells, Influencing the Proliferative Potential and Resistance to Bortezomib. opublikowany bieżącym roku w czasopiśmie *Nutrients*. (IF 5,9) W pracy Doktorant ocenia efekt suplementacji Vitaminy D i K na zmiany epigenetyczne, które mają bezpośredni wpływ na potencjał proliferacyjny plazmocytów. W modelu doświadczalnym ujawnia zmiany i globalny wzrost poziomu metylacji w komórkach szpiczaka opornych na BTZ, inkubowanych z VD jak również w połączeniu VK. Autor, równoległe identyfikuje geny o zmienionym poziomie metylacji, odpowiedzialne za niestabilność molekularną, proliferację czy progresję w szpiczaku plazmocytowym oraz wielu nowotworach układu krwiotwórczego. Doktorant wskazuje na rolę kilku genów min. ARHGAP26, MYH10, czy CLEC12B, którego obserwowane w eksperymencie zaburzenia funkcji wiążą się z progresją wielu nowotworów. W podsumowaniu Autor zwraca uwagę na potencjalną rolę Vitaminy D i K, ich bezpośredni wpływ na procesy metylacji kluczowych dla onkogenezy badanych genów oraz rolę VD i VK ograniczającą potencjał proliferacyjny komórek szpiczaka plazmocytoowego.

Wszystkie prezentowane prace są bardzo interesujące oraz posiadają istotne walory poznawcze. Dostarczają wielu nowych, wartościowych obserwacji klinicznych dotyczących potencjalnych korzyści z terapii adjuwantowej VD i VK chorych z SzP. Recenzowane prace, odnoszą się do niestabilności genetycznej nowotorowych plazmocytów, która wynika min. z globalnej metylacji badanych genów oraz ujawnia podłoże molekularne, które ma bezpośredni wpływ na niepomyślny, agresywny przebieg szpiczaka. W moim odczuciu, jest to zbiór inspirujących nowych odkryć w molekularnym, epigenetycznym krajobrazie procesów transformacji oraz nowotworzenia, a wyniki przeprowadzonych badań mogą być wykorzystane do poszukiwań nowych metod leczenia tym bardziej, że jak pokazuje praktyka kliniczna ostatnich lat w leczeniu szpiczaka dominuje nowoczesna immunoterapia. Należy jednocześnie podkreślić, że ilość informacji, ich jakość, jakość opracowania statystycznego jest imponująca, a wartość merytoryczna pracy jest nie do podważenia

Publikacje naukowe lek. med. Piotra Kuliga są fragmentem dużego projektu naukowego, którego od wielu lat głównym pomysłodawcą i architektem jest promotor pomocniczy recenzowanej pracy doktorskiej Profesor Bogusław Machaliński. Dzięki wieloletniej współpracy Kliniki Hematologii UM w Szczecinie oraz osobistym kontaktom naukowym profesora Bogusława Machalińskiego oraz profesora Bartłomieja Baumerta z wieloma krajowymi i europejskimi ośrodkami naukowymi, zebrano i opublikowano unikalne w skali międzynarodowej doświadczenia opisujące mechanizmy epigenetycznych procesów wielolekowej oporności czy mechanizmów toksyczności inhibitorów proteasomu które między innymi dotyczą powszechnie występującej polineuropatii w grupie leczonych chorych na szpiczaka. Ze swej strony dodam, iż w dobie terapii opartych na lekach celowanych z grupy min. inhibitorów białek proteasomu opublikowane przez Doktoranta obserwacje mogą mieć kardynalne znaczenie terapeutyczne w niedalekiej przyszłości.

W tym kontekście wybór tematu rozprawy doktorskiej lek. med. Piotra Kuliga uznaję za aktualny i uzasadniony naukowo.

Wstęp rozprawy jest bardzo szczegółowym i obszernym opisem aktualnej wiedzy, obejmującym epidemiologię oraz obraz kliniczny i terapeutyczny szpiczaka plazmocytozy. Autor w interesujący sposób omawia mechanizmy działania bertezomibu (BTZ), pierwszej generacji selektywnego i odwracalnego inhibitora podjednostki 26S proteasomu, odpowiedzialną za wewnątrzkomórkową degradację ubikwitylizowanych białek. Następnie skupia się nad rozwojem i postępem badań klinicznych z wykorzystaniem BTZ. Opisuje precyzyjnie właściwości farmakokinetyczne oraz bezpieczeństwo i potencjalne działania niepożądane BTZ w oparciu o wyniki badań. Dalej, omawia mechanizm działania BTZ ich podłoże molekularne oraz charakteryzuje predyspozycje genetyczne do wystąpienia określonych postaci tego nowotworu. W rozdziale tym dość szczegółowo opisane zostały molekularne czynniki ryzyka oraz nowoczesne techniki ich wykrywania. Umiejętność wiązania informacji z różnych dziedzin biologii z obserwacjami klinicznymi jest cennym atrybutem wskazującym na szeroką wiedzę z odpowiednim łączeniem faktów przez Doktoranta.

Uważam, że wstęp rozprawy wyczerpująco wprowadza w problematykę podjętą w badaniach.

W celu pracy Autor prezentuje poprawnie formułowane hipotezy badawcze, wyróżniając trzy podstawowe problemy badawcze, których rozwiązanie pozwoli w założeniu Doktoranta, uzyskać precyzyjną odpowiedź na postawione założenia i tezy rozprawy doktorskiej. Postawiony cel pracy obejmuje zróżnicowane, lecz spójne zagadnienia. Wskazuje to na dobre, wielopłaszczyznowe zorientowanie Doktoranta w zakresie zaplanowanych badań i jest odpowiednim punktem wyjścia do przeprowadzenia eksperymentów oraz zaprojektowanej analizy danych klinicznych z wynikami przeprowadzonych badań naukowych.

Postawione hipotezy badawcze są ciekawe, a ich analiza może po dalszych dogłębnych badaniach stanowić istotną wartość o charakterze klinicznym.

Material i metody zostały opisane z dbałością o szczegóły. Opis procedur badawczych umieszczony w opublikowanych pracach oryginalnych jest klarowny. Metodyka, na której oparto część badawczą pracy jest bardzo nowoczesna i dobrana adekwatnie do realizacji założonych celów pracy. W rozdziale tym, Doktorant umieścił zestawienie badań wykonywanych w trakcie realizacji statystycznej analizy poszczególnych eksperymentów.

Wnioski oparte są w pełni na uzyskanych wynikach wskazując, które z nich stanowią najistotniejsze osiągnięcia pracy badawczej składającej się na rozprawę doktorską. Wykonane podsumowanie jest zwięzłe zawierające ogólne spostrzeżenia jak również sugestie Autora dotyczące potencjalnej możliwości praktycznego wykorzystania uzyskanych wyników.

Dyskusja stanowi bardzo obszerny fragment ocenianej rozprawy i została przeprowadzona w opublikowanych pracach w sposób rzeczowy, zarówno w oparciu o własną wiedzę jak i informacje pochodzące z najnowszej światowej literatury, co świadczy o dojrzałości badawczej Doktorantki oraz wysoce merytorycznej opiece Promotorów. Całość badań z odnosząca się do nich dyskusją zebrana jest w trzech opublikowanych artykułach naukowych, o istotnym współczynniku wpływu (**IF-16,7-** dla całości zaprezentowanych prac).

W mojej ocenie Doktorant w sposób przemyślany łączy fakty i konsekwentnie stara się interpretować uzyskane wyniki mając na uwadze postawione hipotezy badawcze. Na uwagę zasługuje wykonana przez Autorkę interpretacja

uzyskanych wyników, ich trafne wytłumaczenie oraz przeprowadzenie nieschematycznych podsumowań.

Recenzowana rozprawa zawiera **streszczenie** w języku polskim i angielskim. Rozdział ten obejmuje niezbędną charakterystykę dotyczącą założeń badawczych podejmowanych w pracy, uzyskanych wyników oraz ich interpretacji w odniesieniu do uwarunkowań klinicznych. Rozdział, choć umieszczony na końcu dysertacji, umożliwia szybkie zorientowanie się w zakresie pracy badawczej oraz celowości podjęcia opisanych i opublikowanych badań

Podsumowując, stwierdzam, że Doktorant w pełni wypełnił zadania, jakie zostały postawione w celu pracy. Istotnym osiągnięciem ocenianej dysertacji jest również umiejętność wykazania się przez Autora naukową pokorą, wobec różnorodności obserwowanych zdarzeń klinicznych, konfrontowanych z dobrą praktyką medyczną. Poprzez swą nietypowość nie mogą one być objęte analizą statystyczną a wymagają równie nietypowych, indywidualnych decyzji klinicznych w odniesieniu do trudnej diagnostyki molekularnej i terapii szpiczaka plazmocytozy. Doktorant wykazał bardzo dobre zorientowanie w aktualnych doniesieniach literatury światowej dotyczącej zaplanowanych badań. Interpretacja wyników jest odpowiednia jak również na uznanie zasługuje umiejętność powściągliwego i odpowiedzialnego wyprowadzenia wniosków. Wartość pracy i uzyskanych wyników badań Doktoranta, potwierdzona została akceptacją międzynarodowego środowiska naukowego oraz ich publikacją w renomowanych czasopiśmie o wysokim współczynniku wpływu.

Rozprawa doktorska lek. med. Piotra Kuliga jest opracowaniem spełniającym wszystkie warunki wymagane odpowiednią ustawą - art.13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki. (Dz.U.2016, poz. 882 z późn.zm.) - dla dysertacji doktorskich. Praca ma charakter poznawczy i niewątpliwie posiada niezwykle ciekawe implikacje kliniczne. Stanowi również podstawę do dalszych badań laboratoryjnych i klinicznych.

W mojej ocenie zasługuje na **wyróżnienie** z uwagi na wyjątkowo wysoki poziom naukowy, ogromny wkład pracy włożony w zebranie wszystkich danych i staranne opracowanie rozprawy, nowoczesną metodykę badań, umiejętność

rozwiązywania trudnych problemów naukowych oraz przeprowadzenia krytycznej dyskusji własnych wyników badań w odniesieniu do piśmiennictwa.

Zgłaszam wniosek o wyróżnienie pracy

Z całą pewnością praca lek. Med. Piotra Kuliga jest jedną z najlepszych ocenianych przeze mnie dysertacji doktorskich. Ogólny dorobek naukowy z uwzględnieniem ocenianej pracy stanowi znakomitą podstawę kolejnego bardzo szybkiego awansu naukowego Autora.

Mam zaszczyt przedstawić Wysokiej Radzie Wydziału Lekarskiego Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie **wysoce pozytywną recenzję** i wnoszę o dopuszczenie lek. med. Piotra Kuliga do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Prof. dr hab. n. med. Marek Hus
hematolog
1736999

