

Łódź, 01.12.2023

Prof. dr hab. n. med. Joanna Góra-Tybor

Klinika Hematologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

Ocena rozprawy doktorskiej lek. Patryka Sobieralskiego pt. „Zależność pomiędzy dynamiką zmian molekularnych a obrazem klinicznym w nowotworach mieloproliferacyjnych”

Trzy najczęstsze nowotwory mieloproliferacyjne (MPN) BCR-ABL ujemne to czerwienica prawdziwa (PV), nadpłytkowość samoistna (ET) i mielofibroza pierwotna (PMF). Za czynnik bezpośrednio odpowiedzialny za rozwój MPN i klonalną proliferację krwiotwórczych komórek macierzystych uważa się występowanie określonych mutacji somatycznych tzw. mutacji „wiodących” (driver mutations). Prawidłowa hematopoeza zależy od aktywacji szlaku JAK/STAT5 przez hemopoetyczne cytokiny i ich receptory. Kinaza JAK2 należy do cytoplazmatycznych kinaz tyrozynowych i jest elementem szlaku sygnałowego zależnego od receptorów cytokinowych, prowadzącego do aktywacji czynników transkrypcyjnych STAT (signal transducers and activators of transcription). Fizjologicznie do hiperaktywacji tego szlaku prowadzą takie stany jak: krwawienie, hipoksja, zapalenie. W przypadku MPN za konstytutywną aktywację szlaku JAK/STAT5 odpowiadają mutacje w jednym z trzech genów: JAK2 (Janus kinase 2; 9p24), MPL (myeloproliferative leukemia virus oncogene; 1p34) W515L/K w receptorze dla trombopoetyny (TPO) i CALR (białko kalretikulina). U większości pacjentów z PV obecna jest mutacja somatyczna genu kinazy tyrozynowej JAK2, u 96% dotyczy ona eksonu 14 (mutacja V617F) i u 3% eksonu 12. W przypadku ET i PMF mutację JAK2 V617F stwierdza się u około 50–60% pacjentów, u 30% mutację genu kodującego białko CALR, 5–10% chorych charakteryzuje się mutacją genu MPL W515L/K, a kilka procent chorych to tzw. pacjenci potrójnie ujemni, u których nie stwierdza się żadnej z wymienionych mutacji. Mutacje CALR i MPL, podobnie jak mutacje JAK2 powodują konstytutywną aktywację szlaku JAK-STAT5. Poza wymienionymi mutacjami „wiodącymi” (driver mutations) istotną rolę, zwłaszcza w patogenezie PMF, odgrywają również mutacje genów zaangażowanych w mechanizmy

epigenetyczne. Należą do nich mutacje genów biorących udział w procesach potranslacyjnej modyfikacji histonów (ASXL1, EZH2), metylacji DNA (TET2, DNMT3A, IDH1/2), splicingu mRNA (SRFS2, SRF3B1) oraz procesach naprawy DNA (TP53).

Zgodnie z aktualną wiedzą rozwój MPN jest wypadkową wpływu mutacji „inicjujących”, dodatkowych mutacji epigenetycznych i działania czynników związanych z przewlekłym procesem zapalnym. Zapalenie jest wynikiem zarówno działania cytokin zależnych od profilu mutacji charakterystycznego dla danego pacjenta jak i czynników zewnętrznych takich jak palenie tytoniu, dieta bogatotłuszczowa, współwystępowanie chorób autoimmunologicznych.

Nadal nie jest jasne, dlaczego przy obecności tej samej mutacji inicjującej (np. JAK2) obserwujemy różne fenotypy MPN (PV, ET, PMF). Co więcej poszczególne MPN mogą zmieniać swój fenotyp, i tak ET może transformować w PV lub PMF, a PV w PMF, co ma bardzo istotne implikacje kliniczne. Wydaje się, że na fenotyp MPN mają wpływ dodatkowe mutacje epigenetyczne, ładunek zmutowanego allele mutacji wiodacej, a także kolejność pojawiania się mutacji. Niniejsza rozprawa doktorska dotyczy zatem bardzo aktualnego tematu.

Rozprawa doktorska powstała w oparciu o monotematyczny cykl czterech artykułów:

1. Patryk Sobieralski, Aleksandra Leszczyńska, Maria Bieniaszewska: Late polycythemic transformation in JAK2-mutated essential thrombocythemia patients—characteristics along with a validation of 2016 WHO criteria: *European Journal of Haematology*, 2019, 10.1111/ejh.13320
2. Patryk Sobieralski, Maria Bieniaszewska, Aleksandra Leszczyńska, Monika Żuk, Bartosz Wasąg, Jan Maciej Zaucha: Secondary chronic myeloid leukemia in a patient with CALR and ASXL1-mutated primary myelofibrosis: *International Journal of Hematology*, 2022, 10.1007/s12185-022-03331-x
3. Maria Bieniaszewska, Patryk Sobieralski, Aleksandra Leszczyńska, Magdalena Dutka: Anagrelide in essential thrombocythemia: Efficacy and long-term consequences in young patient population: *Leukemia Research*, 2022, 10.1016/j.leukres.2022.106962
4. Patryk Sobieralski, Bartosz Wasąg, Aleksandra Leszczyńska, Monika Żuk, Maria Bieniaszewska: The molecular profile in patients with polycythemia vera and essential thrombocythemia is dynamic and correlates with disease's phenotype. *Frontiers in Oncology*, 2023, 10.3389/fonc.2023.1224590

Dla wymienionego cyklu publikacji łączna punktacja MNiSW wynosi 310, łączna wartość wskaźnika oddziaływania (IF): 11,72

W swojej pracy badawczej doktorant starał się zidentyfikować wpływ profilu molekularnego na obraz kliniczny nowotworów mieloproliferacyjnych.

Postawione cele pracy to:

Cel zasadniczy:

- Potwierdzenie dynamicznego charakteru profilu molekularnego oraz jego wpływu na obraz kliniczny u pacjentów z rozpoznaniem czerwienicy prawdziwej i nadpłytkowości samoistnej

Cele dodatkowe:

- Konfrontacja użyteczności kryteriów diagnostycznych z przebiegiem klinicznym choroby pacjentów z czerwienicą prawdziwą i nadpłytkowością samoistną
- Ocena przydatności klinicznej stosowanych systemów prognostycznych w czerwienicy prawdziwej i nadpłytkowości samoistnej
- Identyfikacja czynników mogących odpowiadać za ewolucję klonalną w nowotworach mieloproliferacyjnych

W pracy "Late polycythemic transformation in JAK2-mutated essential thrombocythemia patients—characteristics along with a validation of 2016 WHO criteria" przeanalizowano dane kliniczno-laboratoryjne z czasu diagnozy u 136 pacjentów z rozpoznaniem ET, u których stwierdzono obecność mutacji JAK2V617F. Transformacje do PV rozpoznano u 14 chorych (mediana obserwacji 9 lat). W tej grupie chorych nie stwierdzono wzrostu VAF dla JAK2V617F. A zatem autorzy podkreślają, że mechanizmy odpowiedzialne za ewolucję fenotypu choroby wydają się być niezależne od zmiany VAF dla mutacji wiodącej i pozostają nieznane.

W kolejnej pracy "Secondary chronic myeloid leukemia in a patient with CALR and ASXL1-mutated primary myelofibrosis" autorzy przedstawiają pacjentkę, u której szczegółowa diagnostyka molekularna pozwoliła na wykrycie współistnienia dwóch nowotworów mieloproliferacyjnych: przewlekłej białaczki szpikowej i PMF, co pozwoliło na wdrożenie właściwego, skutecznego leczenia.

W pracy "Anagrelide in essential thrombocythemia: Efficacy and long-term consequences in young patient population" autorzy analizują skuteczność i powikłania terapii anagrelidem u 48 młodszych (< 60 roku życia) pacjentów z ET, u których czas ekspozycji na anagrelid wynosił co najmniej 10 lat. Anagrelid, jakkolwiek uznany jako standardowa terapia ET, zwłaszcza u pacjentów młodszych, pozostaje kontrowersyjny ze względu na potencjalne działanie przyspieszające włóknienie szpiku. Analizując grupę badaną wykazano, że lepszą odpowiedzią na lek cechują się pacjenci, u których wykrywalna jest mutacja JAK2V617F, w porównaniu do pacjentów z mutacją w genie CALR, MPL, lub u których nie wykrywa się żadnej mutacji. Ponadto pacjenci obciążeni mutacją JAK2V617F cechują się najkorzystniejszym profilem toksyczności – najrzadziej obserwowano u nich niedokrwistość, żaden z pacjentów nie rozwinął wtórnego włóknienia szpiku. Włóknienie szpiku stwierdzono u 7 pacjentów: 5 z mutacją CALR, 1 z MPL i 1 potrójnie ujemnego. Autorzy wskazują na znaczenie profilu molekularnego w wyborze terapii dla młodszych pacjentów z ET.

Ostatnia cytowana praca „The molecular profile in patients with polycythemia vera and essential thrombocythemia is dynamic and correlates with disease's phenotype” dotyczy analizy profilu molekularnego 49 pacjentów z ET lub PV z wieloletnim przebiegiem MPN, u których dzięki biobankowaniu materiału genetycznego uzyskano dostęp do zabezpieczonego DNA z czasu diagnozy. Umożliwiło to prześledzenie zmian w profilu molekularnym na przestrzeni mediany obserwacji 104 miesięcy. Dzięki porównaniu występowania poszczególnych mutacji oraz ilościowego obciążenia zmutowanym allelem w dwóch punktach czasowych, potwierdzono dynamiczną naturę profilu molekularnego u pacjentów z PV i ET. U 9 pacjentów doszło do transformacji w mielofibrozę w okresie obserwacji. Chorzy ci charakteryzowali się trendem do wyższego VAF dla mutacji wiodącej przy diagnozie oraz istotnie wyższym VAF w drugiej próbce. Ponadto wykryto u nich mutacje, u części obecne już w pierwszej próbce, opisane jako związane ze złym rokowaniem w MPN np. ASXL1, RUNX1, U2AF1. U dwóch pacjentów, sklasyfikowanych jako grupa ryzyka niskiego, doszło do powikłań zakrzepowo zatorowych w czasie obserwacji. Analiza molekularna wykazała narastanie VAF

mutacji JAK2Val5617Phe u jednego z nich oraz obecność patogennego wariantu genu ZRSR2, który opisywano u pacjentów rozwijających powikłania zakrzepowo-zatorowe, u drugiego.

Podsumowując wyniki przeprowadzonych badań doktorant trafnie podkreśla:

- potrzebę rozszerzenia obowiązujących kryteriów diagnostycznych i systemów prognostycznych o szczegółowe analizy molekularne.
- konieczność uważnej interpretacji wyników badań molekularnych, z włączeniem oceny ilościowej, oceny dynamiki oraz oceny patogenności poszczególnych wariantów.
- konieczność kontynuacji badań w zakresie diagnostyki molekularnej oraz istotność wielokrotnej ewaluacji choroby w trakcie jej trwania.

Po wnikliwej analizie rozprawy doktorskiej mam następujące uwagi:

Wybór tematu rozprawy doktorskiej jest bardzo aktualny, doktorant zrealizował założone cele pracy. Na podkreślenie zasługuje stworzenie bazy danych pacjentów z MPN leczonych w Klinice Hematologii i Transplantologii w Gdańsku, które umożliwiło szeroko zakrojone badania nad tą grupą chorych. Uzyskane przez Doktoranta wyniki wskazują na kluczową rolę szczegółowej oceny profilu molekularnego pacjenta z MPN w postawieniu właściwej diagnozy, prognozowaniu i wyborze najskuteczniejszej terapii. Decyzja o wdrożeniu terapii cytoredukcyjnej u chorych na PV i ET dotychczas opiera się na tradycyjnych kryteriach kwalifikacji do grupy „wysokiego” i „niskiego” ryzyka. Wydaje się, że w najbliższej przyszłości, wraz ze zwiększeniem dostępu do techniki NGS, ocena profilu molekularnego nie tylko w momencie diagnozy choroby, ale również w trakcie jej trwania, umożliwi dokładniejszą charakterystykę pacjentów i oparcie decyzji terapeutycznych na bardziej precyzyjnych kryteriach. Aktualnie praktyczne znaczenie mają obserwacje Doktoranta dotyczące wpływu rodzaju mutacji wiodącej na skuteczność i toksyczność terapii anagrelidem – wybór tego leku może być bardziej uzasadniony u pacjentów z ET JAK plus.

Pewne wątpliwości budzi stanowcze podkreślenie przez Doktoranta ograniczonej użyteczności istniejących systemów prognostycznych. Indeksy MIPSS-PV i MIPSS-ET odnoszą się do prawdopodobieństwa przeżycia, zostały skonstruowane na podstawie długoletnich obserwacji dużej grupy pacjentów. Wnioski płynące z pracy „The molecular profile in patients with polycythemia vera and essential thrombocythemia is dynamic and correlates with

disease's phenotype" powinny być potwierdzona na większych grupach chorych, w tym celu wskazana byłaby współpraca polskich ośrodków hematologicznych.

Podsumowując: uważam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 13 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. 5 z późn. zm.).

Mam zaszczyt przedstawić Radzie Nauk Medycznych Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego recenzję pracy i prosić o dopuszczenie lek. Patryka Sobieralskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ze względu na aktualność tematu, praktyczne znaczenie obserwacji i wniosków płynących z przeprowadzonych analiz wnioskuję o wyróżnienie pracy.

Prof. dr hab. med. Joanna Góra-Tybor

Prof. dr hab. med.  
**JOANNA GÓRA-TYBOR**  
Hematolog  
Specjalista chorób wewnętrznych  
1641413

J. Góra-Tybor