

Lublin dnia 05.06.2017

Recenzja

rozprawy doktorskiej lek. med. Fryderyka Lorenza

pt.: "*Badania nad znaczeniem stężenia ferrytyny w surowicy krwi w chorobie Gauchera, limfohistiocytozie hemofagocytarnej oraz przed allogenicznym przeszczepieniem komórek hematopoetycznych*" wykonanej w Hematologii Center Karolinska, Karolinska University Hospital Huddinge w Sztokholmie oraz w Department of Radiation Sciences, Section of Hematology, Umea University w Umea, Szwecja, pod kierunkiem prof. dr hab. n. med. Aleksandra B. Skotnickiego i dr hab. n. med. Macieja Machaczki

Ferrytyna odgrywa znaczącą rolę w regulacji gospodarki żelazem przede wszystkim poprzez magazynowanie nadmiaru jonów żelaza i zabezpieczanie tkanek przed jego toksycznym wpływem. Frakcja ferrytyny komórkowej, obecna w surowicy krwi odzwierciedla ustrojowe zasoby żelaza. Obniżenie stężenia żelaza oraz ferrytyny w surowicy krwi świadczy o rzeczywistym niedoborze żelaza, wyczerpaniu jego zapasów tkankowych i prowadzi do rozwoju niedokrwistości. Dlatego oznaczanie stężenia ferrytyny w surowicy krwi odgrywa ważną rolę w diagnostyce niedokrwistości. Natomiast w stanach nadmiaru żelaza i w stanach zapalnych stężenie ferrytyny wzrasta. Hyperferrytynemia może niekorzystnie wpływać na układ odpornościowy a w konsekwencji zwiększać ryzyko infekcji bakteryjnych, grzybiczych i wirusowych oraz osłabiać reakcję cytotoksyczną przeciwko komórkom nowotworowym. Wzrost stężenia ferrytyny pogarsza rokowanie u chorych na zespoły mielodysplastyczne poddanych procedurze transplantacji komórek hematopoetycznych. W chorobie Gauchera, w limfohistiocytozie hemofagocytarnej wtórnej do procesu nowotworowego obserwuje się zwiększenie stężenia ferrytyny co ma przede wszystkim znaczenie diagnostyczne. Natomiast u chorych z rozrostowymi chorobami hematologicznymi poddawanych procedurze alloSCT może mieć znaczenie prognostyczne.

Biorąc pod uwagę te fakty należy uznać, że temat badań wybrany przez doktoranta jest jak najbardziej słuszny i może przyczynić się do dalszego poszerzenia wiedzy dotyczącej diagnostycznej i prognostycznej roli hyperferrytynemii w wybranych chorobach hematologicznych.

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska lek. med. Fryderyka Lorenza "*Badania nad znaczeniem stężenia ferrytyny w surowicy krwi w chorobie Gauchera, limfohistiocytozie hemofagocytarnej oraz przed allogenicznym przeszczepieniem komórek hematopoetycznych*" oparta jest na spójnym tematycznie cyklu 5 ciu prac -3 prac oryginalnych (dwóch opublikowanych i jednej w formie manuskryptu), jednego opisu przypadku i jednej pracy poglądowej dotyczącej m.in. wartości diagnostycznej ferrytynemii w chorobie Gauchera. Dwie prace oryginalne i opis przypadku zostały opublikowane w recenzowanych czasopismach naukowych w języku angielskim i posiadają sumarycznie 7,251 IF i 75 pkt MNiSW. Praca poglądowa została opublikowana w czasopiśmie polskim i posiada 14 punktów MNiSW. W 3 pracach stanowiących rozprawę doktorską Doktorant jest pierwszym autorem, w dwóch jest drugim autorem ale jego wkład w wykonanie opublikowanego materiału jest dominujący. Udział doktoranta w przygotowaniu wszystkich publikacji został potwierdzony stosownymi oświadczeniami współautorów, zamieszczonymi na końcu pracy doktorskiej.

Struktura i podział treści pracy nie budzą zastrzeżeń. Praca zawiera : wykaz publikacji stanowiących rozprawę doktorską, streszczenie w języku polskim i angielskim, wstęp, założenia i cele pracy, materiał i metodykę, podsumowanie, piśmiennictwo, podziękowania, kopie publikacji w oryginalnej wersji językowej, oświadczenia współautorów i opinie komisji bioetycznej w języku szwedzkim.

We wstępie autor wprowadza czytelnika w tematykę podjętych badań. Omawia zarys historyczny badań nad gospodarką żelaza następnie samą gospodarkę żelaza z uwzględnieniem fizjologicznej roli ferrytyny oraz jej znaczenia w procesach zapalnych. Następnie przedstawia najważniejsze informacje dotyczące jednostek chorobowych stanowiących przedmiot badania: allogenicznej transplantacji krwiotwórczych komórek macierzystych, choroby Gauchera i limfohistiocytozy hemofagocytarnej. W każdej jednostce chorobowej wskazuje na rolę hyperferrytynemii.

W następnej części autor formułuje szczegółowe cele swojej pracy :

1. Czy podwyższenie stężenia ferrytyny w surowicy oceniane u chorych przed rozpoczęciem procedury alloSCT ma znaczenie dla prognozowania RFS oraz OS?
2. Czy podwyższenie stężenia ferrytyny w surowicy oceniane u chorych przed rozpoczęciem procedury alloSCT wpływa na częstość występowania GVHD?
3. Czy hiperferrytynemia wykazuje korelację ze szczególnym fenotypem lub stopniem ciężkości GD1?
4. Czy hiperferrytynemia wykazuje korelację z określonymi objawami klinicznymi i laboratoryjnymi u chorych na M-HLH?
5. Czy hiperferrytynemia związana jest z określonym profilem morfologiczno-czynnościowym układu odpornościowego w GD1 oraz M-HLH?

Cykl publikacji , który składa się na rozprawę doktorską podzielony jest na trzy części. Badaniami zostało objętych 396 chorych w tym 309 z nowotworami hematologicznymi poddanych zabiegowi alloSCT, 16 dorosłych z chorobą Gauchera typ 1 oraz 71 z dorosłych z zespołem HLH w przebiegu schorzeń nowotworowych.

W oryginalnej pracy pt. *"Hyperferritinemia is associated with low incidence of graft versus host disease , high relapse rate and impaired survival in patients with blood disorders receiving allogeneic hematopoietic stem cell grafts."* opublikowanej w czasopiśmie z Listy Filadelfijskiej *Medical Oncology* (IF 2,140) autor poddał analizie dużą grupę 309 chorych leczonych zabiegiem allo przeszczepienia komórek hematopoetycznych szpiku. Stwierdził, że hiperferrytynemia przed zabiegiem jest niekorzystnym czynnikiem rokowniczym i koreluje istotnie ze zmniejszoną przeżywalnością oraz zwiększoną częstością wystąpienia wznowy choroby w porównaniu z chorymi , u których przed alloSCT stężenie ferrytyny nie było podwyższone. Hyperferrytynemia w tej grupie chorych wynika przede wszystkim z przeładowania żelazem na skutek częstych przetoczeń koncentratu krwinek czerwonych ale jest również wyrazem aktywacji białek ostrej fazy w związku z

wystąpieniem infekcji oraz polekowego uszkodzenia wątroby. Autor wykazał ponadto, że hiperferrytynemia wiąże się ze zmniejszoną częstością występowania cGVHD. Powodem tego zjawiska może być supresyjne działanie ferrytyny na limfocyty dawcy biorące udział w reakcji przeszczep przeciwko białaczce (graft versus leukemia: GVL). Osłabienie tej reakcji zwiększa ryzyko wznowy choroby i niekorzystnie wpływa na przeżycie chorych.

Druga oryginalna praca zaliczona do cyklu została opublikowana w Blood Cells, Molecules and Diseases pt. *Ferritinemia and serum inflammatory cytokines in Swedish adults with Gaucher disease type 1*. 2016 :1-8 .Epub ahead of print, IF 2,731, MNiSW 25 pkt. Autor po stwierdzeniu podwyższenia stężenia surowiczej ferrytyny u 81% chorych z GD1(choroba Gauchera typu 1) próbuje wyjaśnić przyczynę i znaczenie tego zjawiska. W chorobie Gauchera stwierdzono istnienie przewlekłego stanu zapalnego mediowanego przez makrofagi typu 1(M1). Natomiast same komórki Gauchera posiadają cechy makrofagów alternatywnych M2 wydzielających cytokiny o profilu przeciwzapalnym. Przypuszczać można, że komórki Gauchera pełnią rolę ochronną poprzez produkcję cytokin hamujących reakcję zapalną mediowaną przez M1. Komórki Gauchera będąc makrofagami typu 2 posiadają zdolność wydzielania żelaza do otaczających tkanek, co może wyjaśnić obecność hiperferrytynemi w chorobie Gauchera. Hiperferrytynemia powoduje zwiększone ryzyko infekcji i chorób nowotworowych u chorych na GD1 w następstwie obniżenia aktywności komórek biorących udział w odporności humoralnej i komórkowej. Nie stwierdzono natomiast korelacji ferrytynemii ze stopniem zaawansowania klinicznego GD1.Pod wpływem leczenia ferrytynemia zmniejszała się u wszystkich pacjentów ale nie normalizowała się pomimo stosowania leczenia substytucyjnego. Hiperferrytynemia jest charakterystyczna dla hemochromatozy wywołanej mutacjami genu *HFE*. Autor wykluczył obecność mutacji genu *HFE* w badanej grupie chorych z GD1.

Ilustracją znaczenia hiperferrytynemi w infekcjach jest opis przypadku chorego z chorobą Gauchera i współistniejącym zapaleniem płuc wywołanym mieszanymi patogenami : *Aspergillus fumigatus* , *Aspergillus nidulans* oraz *Mycobacterium avium*. Przypadek został opublikowany w Upsala Journal of Medical Science pt."*Recurrent pulmonary aspergillosis and mycobacterial infection in an unsplenectomized patient with type 1 Gaucher disease*" IF 1,98, MNiSW 30 pkt. U przedstawionego chorego stężenie ferrytyny zwiększało się znacząco w stanach nasilenia objawów infekcji i obniżało się w trakcie remisji

zapalenia płuc pod wpływem antybiotykoterapii niezależnie od aktywności choroby Gauchera. Pacjent bowiem nie przyjmował żadnej formy leczenia GD z powodu objawów ubocznych SRT(substrate reduction therapy) jaką zastosowano wcześniej i odstawiono po 4 miesiącach z uwagi na objawy uboczne.

Trzecia część pracy doktoranta, dołączona w formie manuskryptu została zatytułowana "*Hyperferritinemia and serum inflammatory cytokines in adults with newly diagnosed hemophagocytic lymphohistiocytosis associated with hematological malignancy : a single institution experience with 71 patients*". Stężenie ferrytyny oceniono w niej w dużej grupie chorych z limfohistiocytozą hemofagocytarną (HLH), która rozwinęła się w przebiegu chorób hematologicznych. Hiperferrytynemię stwierdzono u zdecydowanej większości bo aż u 97% pacjentów. Stanowi ona kryterium diagnostyczne HLH i jest wywołana nadmierną aktywacją makrofagów. W badaniach własnych autor potwierdził wysokie stężenie rozpuszczalnego receptora IL-2 (sIL-2R α) u 91% chorych za przyczynę którego uważa się niepohamowaną stymulację limfocytów T. Również stężenie innych cytokin prozapalnych takich jak TNF α , IL-6 oraz IL-8 było podwyższone. Na zwiększone stężenie ferrytyny poza stanami zapalnymi wpływają również współistniejące choroby autoimmunologiczne, nowotworowe oraz przeładowanie żelazem jako wynik częstych przetoczeń preparatów krwi. Hiperferrytynemia ma w HLH znaczenie przede wszystkim diagnostyczne. W pracy własnej autor wykazał, że u 24% chorych u których HLH rozwinęło się w trakcie chemioterapii powikłanej infekcją przeżywalność była znacznie większa niż u chorych u których HLH wystąpiło w trakcie rozpoznania, progresji lub wznowy choroby nowotworowej. Stężenie ferrytyny nie różniło się jednak w zależności od tego na jakim etapie choroby hematologicznej doszło do rozwoju HLH. 94% badanych pacjentów poddano leczeniu ale zaledwie 44% z nich uzyskało remisję HLH. Pozostali pacjenci, którzy nie uzyskali remisji zmarli. Poziom ferrytyny i cytokin zapalnych nie różnił się znacząco w tych grupach chorych.

Praca pogładowa stanowiąca część rozprawy doktorskiej przedstawia aktualny stan wiedzy na temat znaczenia hiperferrytynemii ale tylko w jednej z jednostek chorobowych badanych w recenzowanej pracy a mianowicie w chorobie Gauchera.

Na podstawie badań i analiz opisanych w publikacjach autor wyciągnął trafne i merytoryczne wnioski:

1. Hiperferrytynemia stwierdzana w okresie przed rozpoczęciem procedury alloSCT ma niekorzystny wpływ na wskaźniki przeżycia OS i RFS.
2. Hiperferrytynemia stwierdzana w okresie przed rozpoczęciem procedury alloSCT koreluje ze zmniejszoną częstością występowania cGVHD.
3. Hiperferrytynemia u pacjentów z GD1 nie wykazuje korelacji z fenotypem lub stopniem ciężkości choroby wg skali SSI Zimrana.
4. Hiperferrytynemia u chorych z GD1 koreluje z podwyższonym stężeniem cytokiny prozapalnej TNF- α w surowicy, umiarkowanym podwyższeniem stężenia beta2M oraz niskim stężeniem sIL-2R α .
5. U leczonych chorych na GD1 stwierdzono obniżenie stężenia ferrytyny oraz normalizację stężenia TNF α w surowicy.
6. Hiperferrytynemia u chorych z M-HLH koreluje z podwyższonym stężeniem sIL-2R α , TNF- α , IL-6, IL-8 oraz IL-10 w surowicy.
7. Hiperferrytynemia u chorych na M-HLH nie koreluje z podwyższonym stężeniem IL-1 β .
8. Poziom hiperferrytynemii nie wykazywał korelacji z określonymi objawami klinicznymi oraz nie miał znaczenia prognostycznego u badanych pacjentów z M-HLH.

Jako recenzent radziłabym zmniejszenie liczby wniosków poprzez połączenie wniosków 1i2, 3i4 oraz 6i7. Ułatwiłoby to moim zdaniem zrozumienie najistotniejszych zmian wykazanych w poszczególnych jednostkach chorobowych. Uważam ponadto, że w polskim opisie wyników badań można byłoby zamiast *"uległo normalizacji"* co w odniesieniu do słowa *"uległo"* ma jednak znaczenie pejoratywne używać *"znormalizowało się"* co ma zdecydowanie w całości pozytywny wydźwięk. Ostatnia drobna uwaga dotyczy wniosków: we wniosku nr 8 poziom hiperferrytynemii (brakuje i).

Chciałabym podkreślić, iż wszystkie moje uwagi i sugestie w żaden sposób nie odnoszą się do merytorycznej strony tej pracy, ani nie obniżają jej wartości.

W podsumowaniu chciałabym podkreślić, że przedstawioną mi do oceny rozprawę doktorską oceniam pozytywnie pod względem formalnym i merytorycznym. W ocenianej pracy autor wykazał się umiejętnością stawiania problemów badawczych i właściwego doboru zestawu metod badawczych oraz ich pełnego opanowania praktycznego, uzyskał i opublikował starannie wartościowe i oryginalne wyniki badań o istotnym znaczeniu poznawczym i rozwojowym dla hematologii. Przedstawiona mi do oceny praca doktorska lek. med. Fryderyka Lorenza pt. *"Badania nad znaczeniem stężenia ferrytyny w surowicy krwi w chorobie Gauchera, limfohistiocytozie hemofagocytarnej oraz przed allogenicznym przeszczepieniem komórek hematopoetycznych"* odpowiada wymogom pracy na stopień doktora określonym w ustawie o stopniach i tytułach naukowych.

W związku z powyższym stawiam Radzie Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Jagiellońskiego -Collegium Medicum w Krakowie wniosek o dopuszczenie kandydata do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Dr hab. Bożena Sokołowska

Dr hab. n. med.
Bożena Sokołowska
HISTORIOLOG
HEMATOLOG

Klinika Hematoonkologii i Transplantacji Szpiku

Uniwersytetu Medycznego w Lublinie