

Uniwersytet Medyczny w Łodzi
Katedra Genetyki Klinicznej i Laboratoryjnej
Zakład Genetyki Klinicznej

Łódź, 10.01.2026r

prof. dr hab. med. Maciej Borowiec
Katedra Genetyki Klinicznej i Laboratoryjnej
Zakładu Genetyki Klinicznej
ul. Pomorska 251, A1, 9p
92-213 Łódź

Recenzja pracy doktorskiej

pt. „Rola kinaz PIM w komórkach nowotworowych i mikrośrodku szpiczaka mnogiego”
wykonaną przez lekarza medycyny Filipa Aleksandra Garbicza w Instytucie Hematologii i
Transfuzjologii, Zakład Hematologii Eksperymentalnej w Warszawie, promotor dysertacji prof. dr hab.
n. med. Przemysław Juszczynski.

Niniejsza rozprawa doktorska została zrealizowana w ramach Grantu Diamentowego (0071/DIA/2016/45) przyznanego przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego, Grantu PRELUDIUM (2018/31/N/NZ5/03214) oraz Grantu ExCELLent, edycja 2022, wspieranego przez PBKM S.A. FamiCord Group. Autor otrzymał dofinansowanie w postaci grantów ETIUDA (2020/36/T/NZ5/00610) i OPUS (2019/35/B/NZ5/02824) Narodowego Centrum Nauki, Stypendium dla Wybitnych Młodych Naukowców (SMN/16/1824/2020) Ministerstwa Edukacji Narodowej i Nauki, Projektu TEAM POIR.04.04.00-00-5C84/17-00 i Projektu TEAM-NET POIR.04.04.00-00-16ED/18 Fundacji na rzecz Nauki Polskiej.

Szpiczak mnogi (MM) to nowotwór hematologiczny charakteryzujący się gromadzeniem klonalnej populacji komórek plazmatycznych w szpiku kostnym. Jest to drugi najczęściej występujący nowotwór krwi po chłoniaku nieziarniczym. Chociaż choroba atakuje głównie szpik kostny, zaawansowany MM może rozprzestrzeniać się do krwi obwodowej, tkanek miękkich i narządów. MM należy do szerszej grupy dyskrazji komórek plazmatycznych, terminu obejmującego spektrum stanów związanych z komórkami plazmatycznymi, w tym samotnego plazmocytoma kości, plazmocytoma pozakostnego, amyloidozy łańcuchów lekkich, monoklonalnych chorób odkładania się łańcuchów lekkich i ciężkich, szpiczaka osteosklerotycznego i samego MM. Cechą charakterystyczną szpiczaka

Katedra Genetyki Klinicznej i Laboratoryjnej

92-213 Łódź, ul. Pomorska 251
tel. 42 272 57 67
e-mail: katedra.genetyki@umed.lodz.pl
w4u.umed.lodz.pl/~genetyka



mnogiego jest produkcja monoklonalnej immunoglobuliny (białka M) przez złośliwe komórki plazmatyczne. Objawy kliniczne MM wynikają zarówno ze skutków białka monoklonalnego, jak i złośliwych komórek plazmatycznych, co prowadzi do hiperkalcemii, dysfunkcji nerek, anemii i chorób kości z uszkodzeniami litycznymi lub złamaniami patologicznymi, zbiorczo znanymi jako kryteria CRAB (podwyższone stężenie wapnia, niewydolność nerek, anemia i uszkodzenia kości). Tradycyjnie leczenie MM rozpoczynano w momencie wykrycia objawów CRAB. Jednak wraz z odkryciem biomarkerów, które identyfikują wysokie ryzyko postępu choroby, kryteria diagnostyczne zostały zaktualizowane, aby umożliwić wcześniejsze rozpoczęcie leczenia w niektórych przypadkach. W ciągu ostatniej dekady poczyniono znaczne postępy w zrozumieniu i leczeniu dyskracji komórek plazmatycznych, w tym w zakresie biologii choroby, opracowaniu skuteczniejszych terapii oraz badaniach genomicznych, które ujawniły, że MM stanowi spektrum chorób o wspólnym obrazie klinicznym. Pomimo tych postępów, nadal potrzebne są nowe strategie leczenia ukierunkowane na podatność na MM, aby poprawić wyniki leczenia i przekształcić MM z choroby którą można leczyć, w chorobę którą można wyleczyć.

MM zazwyczaj objawia się objawami klinicznymi przypisywanymi infiltracji szpiku kostnego przez aberracyjne komórki plazmatyczne i wynikające z tego zaburzenie prawidłowej hematopoezy lub uszkodzenie narządów docelowych. To ostatnie objawia się dysfunkcją nerek, zmianami osteolitycznymi, hiperkalcemią i upośledzeniem funkcji immunologicznych. Jednak u niektórych pacjentów nie występują ani objawy, ani jawne uszkodzenia narządów docelowych i często diagnozuje się je przypadkowo na podstawie wyników badań laboratoryjnych lub radiologicznych uzyskanych podczas rutynowych badań w kierunku innych schorzeń. W niektórych przypadkach obraz kliniczny może być powikłany odkładaniem się paraprotein w narządach takich jak serce, nerki lub układ nerwowy, w postaci złogów łańcuchów lekkich, amyloidu lub łańcuchów ciężkich. Pierwsze objawy mogą również wynikać z działania cytokin wydzielanych przez MM, takich jak IL-6 lub czynnik wzrostu śródbłonnka naczyniowego (VEGF). Pacjenci z MM często doświadczają objawów podsumowanych akronimem CRAB: hiperkalcemia, dysfunkcja nerek, niedokrwistość i zmiany kostne. Jednak we wczesnych stadiach choroba często nie daje żadnych objawów, co może opóźnić rozpoznanie. Kryteria diagnostyczne obejmują obecność białka monoklonalnego we krwi lub moczu, ponad 10% klonalnych komórek plazmatycznych w szpiku kostnym oraz oznaki uszkodzenia narządów docelowych. Zaawansowane techniki obrazowania, takie jak MRI (obrazowanie metodą rezonansu

magnetycznego) i PET-CT (pozytonowa tomografia emisyjna/tomografia komputerowa), wraz z biopsją szpiku kostnego, są niezbędne do prawidłowego określenia stopnia zaawansowania choroby. Niniejsza praca doktorska jest zgodna z zaktualizowanymi kryteriami Międzynarodowej Grupy Roboczej ds. Szpiczaka (IMWG) dotyczącymi diagnozowania MM.

W ciągu ostatnich dwóch dekad opcje leczenia MM znacznie się poszerzyły, wykraczając poza tradycyjną chemioterapię i obejmując terapie celowane, takie jak inhibitory proteasomu (np. bortezomib, karfilzomib), leki immunomodulujące (np. lenalidomid, pomalidomid), a ostatnio przeciwciała monoklonalne i terapie komórkami CAR T (chimeryczne receptory antygenowe komórek T). Chociaż te metody leczenia poprawiły wyniki leczenia pacjentów, często pojawiają się mechanizmy oporności, a nawrotowy lub oporny MM nadal stanowi wyzwanie terapeutyczne. Obecnie wybór leczenia opiera się na ocenie ryzyka zgodnie z wytycznymi konsensusu Mayo Stratification of Myeloma and Risk-Adapted Therapy (mSMART), które podkreślają cytogenetyczne podłoże choroby pacjenta. Większość pacjentów z MM ma nieprawidłowości cytogenetyczne o standardowym ryzyku, podczas gdy około 40% jest klasyfikowanych jako wysokiego ryzyka.

Wybór terapii zależy od czynników specyficznych dla pacjenta, takich jak czynność nerek i neuropatia, a także wiek pacjenta i stopień jego kruchości. Odpowiedź po terapii indukcyjnej jest monitorowana po każdym cyklu. U pacjentów kwalifikujących się do przeszczepu zaleca się pobranie komórek macierzystych do 6. cyklu, aby zapobiec uszkodzeniu komórek macierzystych związanemu z leczeniem. Jeśli pacjent osiągnie bardzo dobrą odpowiedź częściową (VGPR) lub lepszą i nie ma objawów aktywnej choroby, można wykonać badanie minimalnej choroby resztkowej (MRD). Pacjenci, którzy nie osiągną VGPR lub u których wynik testu na MRD będzie pozytywny, mogą otrzymać dodatkową terapię indukcyjną lub przejść do autologicznego przeszczepu komórek macierzystych, przy czym przeszczepy tandemowe lub auto-allo są ograniczone do badań klinicznych. Terapia podtrzymująca zazwyczaj obejmuje doustny lek immunomodulujący, inhibitor proteasomu lub przeciwciało anty-CD38, szczególnie u pacjentów z grupy wysokiego ryzyka lub z suboptymalną odpowiedzią.

Mnogość strategii terapeutycznych ich kombinacji i możliwości zamiennych opcji terapeutycznych, nie daje gwarancji na powodzenie procesu leczniczego u pacjenta. Przedstawione przez Doktoranta możliwości leczenia i analiza powyższych skłoniła badacza do większej uwagi i skupienia naukowego w kierunku kinaz PIM.



Doktorant lek. med. Filip A Garbicz w swojej pracy doktorskiej przyjął za główny cel zbadanie roli kinaz PIM w szpiczaku mnogim, analizując ich wpływ zarówno na złośliwe komórki plazmatyczne, jak i na otaczające mikrośrodowisko, w szczególności komórki śródbłonka związane z MM. poprzez realizację następujących zadań:

- 1) Określenie wzorców ekspresji i aktywacji PIM1, PIM2 i PIM3 w MM.
- 2) Ocena funkcjonalnej zależności komórek MM od kinaz PIM.
- 3) Charakterystyka transkrypcyjnych i mechanistycznych konsekwencji hamowania PIM w MM.
- 4) Zbadanie roli kinaz PIM w mikrośrodowisku związanym z MM.
- 5) Ocena potencjału terapeutycznego hamowania PIM w przedklinicznych modelach MM.

Miejsce prowadzenia badań, profil badawczy i spektrum problemów z jakimi spotyka się zespół specjalistów w Instytucie Hematologii i Transfuzjologii, Zakład Hematologii Eksperymentalnej w Warszawie, nie dziwi więc decyzja nad podjęciem wyzwania wysoce ambitnego. W związku z tym, wybór przez Pana Promotora i Doktoranta tej tematyki badań uważam za bardzo interesujący i w pełni uzasadniony.

Recenzowana praca doktorska jest dysertacją liczącą 223 strony zawierającą 54 ryciny, 28 tabel i 406 pozycji literaturowych w większości pochodzących z ostatniego okresu, które posłużyły do przygotowania monograficznej części poglądowej, doświadczalnej oraz dyskusji nad wynikami badań własnych. Dobór pozycji literaturowych nie budzi zastrzeżeń i wskazuje na to, że tematyka badań jest bardzo aktualna.

Pracę rozpoczyna część teoretyczna licząca 68 stron; zawiera 6 rycin oraz 1 tabelę w pełni przedstawiającą i pozwalającą zrozumieć charakter i skalę trudności tematu. Osobne rozdziały części teoretycznej stanowią zamierzone przejście do obszernego omówienia technik i materiału badawczego, obejmujących linie komórkowe ich genetyczne modyfikacje, wykorzystanie kolonii bakteryjnych, ich modyfikacje poprzez plazmidy oraz transfekcje komórkowe. Jak też analizę specyficznych białek komórkowych, nakreślając w ten sposób wyznaczony sobie tor analizy patomechanizmów i możliwości terapeutycznych jak też interakcji poszczególnych elementów.

Część doświadczalna pracy obejmuje 85 stron. Poświęcona jest charakterystyce modeli in vitro wykorzystywanej w powyższej pracy. Charakterystyce linii komórkowych oraz przybliża skrupulatnie każdy z elementów prowadzenia badań, tj. definiowania inhibitorów, specyfiki komórek



wykorzystywanych na poszczególnych etapach projektu, ich przechowywania i przygotowywania, rodzaju bakterii wykorzystywanych w pracy doświadczalnej czy też identyfikacji, ekstrakcji plazmidowego DNA pochodzącego z poszczególnych etapów pracy doświadczalnej.

Opis procedur metodycznych zastosowanych w prezentowanych badaniach, przedstawieniu uzyskanych wyników oraz ich interpretacji w kontekście danych opublikowanych przez innych autorów.

Przystępując do oceny merytorycznej tej części recenzowanej rozprawy, muszę podkreślić, że prezentowane w niej badania zostały zaplanowane bardzo wszechstronnie, z uwzględnieniem doświadczeń analizujących różne uwarunkowania poszczególnych zagadnień. Oparto je o bardzo nowoczesne, trudne techniki eksperymentalne biologii molekularnej i hodowli tkankowej, z licznymi elementami transfekcji i infekcji plazmidowej proponowanych modeli badawczych.

Aby zbadać rolę kinaz PIM w szpiczaku mnogim (MM), początkowo Doktorant przeanalizował dwa niezależne, publicznie dostępne zestawy danych wygenerowane z badań przesiewowych CRISPR/Cas9 przy użyciu panelu linii komórkowych MM. Kinaza PIM2 zajęła pierwsze miejsce pod względem zależności onkogennych w komórkach MM w obu zestawach danych, co potwierdza kluczową rolę kinaz PIM w patogenezie MM. Nie wykryto takiej zależności dla PIM1 lub PIM3. Zależność złośliwych komórek plazmatycznych od PIM2 była podobna lub przewyższała zależność ustalonych onkogenów MM (np. MYC, IRF4, MAF, IKZF1, IKZF3) i wcześniej rozpoznanych celów leków (np. PSMB5, BCL2, BRD4). Ponadto kompleksowa analiza DepMap Badania linii komórek nowotworowych wykazały, że linie komórkowe MM wykazują unikalną nadekspresję PIM2 w porównaniu ze wszystkimi innymi liniami komórkowymi, nawet tymi z innych nowotworów hematologicznych, takich jak chłoniak i białaczka. Ekspresja PIM2 nie korelowała z zależnością od PIM2 w liniach komórkowych MM, co sugerowało potrzebę zidentyfikowania alternatywnych biomarkerów w celu skuteczniejszej selekcji pacjentów podczas badań klinicznych inhibitorów PIM. Zależność od PIM2 była szczególnie widoczna w liniach komórkowych MM i podgrupie linii chłoniaków B-komórkowych, co sugeruje, że nowotwory te prawdopodobnie najbardziej reagują na zmniejszenie ilości PIM lub hamowanie farmakologiczne. Powyższe, obiecujące dane weryfikowano poprzez analizę ekspresji powyższych kinaz w tkankach pochodzenia zwierzęcego (tkanki mysie) jak i w tkankach ludzkich. W mysich komórkach limfoidalnych, PIM1 i PIM2 były głównie ekspresjonowane w plazmoblastach i komórkach plazmatycznych. PIM3, z drugiej strony, wykazywał

bardziej jednorodną ekspresję, z podwyższonymi poziomami ekspresji głównie na etapie progenitorowym komórek B. W zestawie danych Tabula Sapiens, atlasie transkryptomowym pojedynczych komórek obejmującym wiele narządów ludzkich, PIM2 wykazał znaczące wzbogacenie w komórkach plazmatycznych w porównaniu z innymi typami komórek. Sugeruje to prawdopodobne znaczenie funkcjonalne zarówno w normalnych, jak i złośliwych komórkach plazmatycznych. PIM2 był również obfity w różnych podgrupach komórek T, takich jak komórki T CD4⁺ i pamięci, co wskazuje na możliwe immunomodulacyjne konsekwencje hamowania PIM2 w komórkach T. Natomiast PIM1 i PIM3 były głównie ekspresjonowane w komórkach nabłonkowych i mezenchymalnych, aczkolwiek z istotnymi różnicami. Aby dodatkowo potwierdzić ekspresję kinazy PIM w MM i ocenić domniemany związek ekspresji PIM z objawami klinicznymi choroby, najpierw Doktorant przeanalizował publicznie dostępny zbiór danych scRNAseq obejmujący komórki pobrane od pacjentów w różnych stadiach MM: IgM MGUS, MGUS, SMM, NDMM i RRMM. PIM1 wykazywał podwyższoną ekspresję, głównie w przypadkach IgM MGUS, które często poprzedzają wystąpienie chłoniaków nieziarniczych, takich jak makroglobulinemia Waldenströma. Ekspresja PIM2 pozostawała względnie stabilna we wszystkich stadiach MM, a 100% sekwencjonowanych komórek ekspresjonowało mRNA PIM2. Co istotne, ekspresja PIM3 była istotnie wyższa w komórkach RRMM w porównaniu z komórkami NDMM, co sugeruje możliwą rolę PIM3 w późnym stadium choroby lub oporności na chemioterapię.

Uznając, że poziomy mRNA nie zawsze korelują z poziomami białka, Doktorant ocenił ekspresję białka kinazy PIM za pomocą barwienia immunohistochemicznego. Wykorzystaliśmy panel zwalidowanych przeciwciał kompatybilnych z odwapnionym szpikiem kostnym (PIM1, PIM3) lub skrawkami skrzepu szpiku kostnego (PIM2). Badania te przeprowadzono na mikromacierzach tkankowych (TMA), łączących próbki szpiku kostnego pobranego metodą trepanacji od pacjentów z MM, jak również szpik kostny od zdrowych dawców. Wyniki potwierdzają, że wszystkie trzy kinazy PIM są nadmiernie ekspresjonowane na poziomie białka w MM w porównaniu do normalnych komórek plazmatycznych i że wykazują odmienne wzorce lokalizacji subkomórkowej, co wskazuje na różne funkcje każdego członka rodziny PIM.

Biorąc pod uwagę silny związek między wysoką ekspresją PIM1/2/3 a złym rokowaniem w MM, Doktorant pokusił się o zbadanie mechanizmów leżących u podstaw podwyższonej ekspresji. Regulacja transkrypcji przez wzmacniacze, a zwłaszcza super-wzmacniacze, jest dobrze znanym czynnikiem

napędzającym wysoką i ograniczoną liniowo ekspresję genów w komórkach nowotworowych i prawidłowych komórkach hematopoetycznych. Super-wzmacniacze to duże obszary genomowe oznaczone gęstymi skupiskami aktywnych elementów wzmacniających, charakteryzujące się wysokim poziomem acetylacji H3K27 (H3K27ac). Analizy obejmowały również potencjał terapeutyczny hamowania kinazy PIM w MM, przeprowadziliśmy systematyczny screening leków z użyciem pięciu inhibitorów pan-PIM (MEN1703, PIM447, INCB053914, AZD1208 i SGI1776) w panelu linii komórkowych MM. Analizę procesów apoptotycznych, cytotoxycznych, interakcji cząstek terapeutycznych z poziomami poszczególnych kinaz PIM jak też interakcji komórkowych. Przeprowadzono wiele wymiarowe analizy zbiorów danych. Weryfikując poszczególne wyniki w eksperymentach laboratoryjnych.

Podsumowując tę część pracy chciałbym podkreślić, że wszystkie użyte metody charakteryzują wysoki stopień obiektywizacji danych, a wykorzystane analizy statystyczne nie budzą zastrzeżeń. Wszystkie, przeprowadzone doświadczenia zostały zaplanowane i realizowane ze skrupulatnością i obejmuje założone aspekty prowadzonych badań. Sposób ich prezentacji jest przemyślany, co pozwala śledzić postępy pracy i rejestrować realizację jej kolejnych celów i zadań.

W części Dyskusja Doktorant przedyskutował otrzymane wyniki. I w sposób szczegółowy konfrontuje wyniki własne z bogatą literaturą opisując porównawczo poszczególne etapy i mechanizmy interakcji kinazy PIM wpływając na biologię szpiczaka mnogiego (MM) na dwóch poziomach: Wewnątrzguzowym: w jaki sposób kinazy PIM podtrzymują przeżycie i proliferację złośliwych komórek plazmatycznych, oraz zewnątrzguzowym: w jaki sposób kinazy PIM w niszy szpiku kostnego (BM), zwłaszcza w komórkach śródbłonna (EC), przyczyniają się do mikrośrodowiska sprzyjającego przetrwaniu MM.

Skomplikowalność powyższych powiązań, ich genetyczno-funkcjonalne powiązanie na poziomie komórki świadczy o dużej wiedzy Doktoranta i dojrzałości w przemyśleniu tematu. A jej rzetelność i zaangażowanie znalazło odbicie w mnogości narzędzi biologii molekularnej i analiz statystycznych użytych w powyższej rozprawie doktorskiej.

Wyrazem powyższych są precyzyjne i w pełni zasadne wnioski zaproponowane przez Doktoranta podsumowujące powyższą pracę. Wnioski te są jednocześnie dowodem na zrealizowanie w pełni przez Doktoranta celów jego dysertacji.

Podsumowując, z pełnym przekonaniem uważam, że recenzowana rozprawa doktorska lekarza medycyny Filipa Aleksandra Garbicza spełnia wymogi stawiane takim dysertacjom. Stanowi ona samodzielne i oryginalne rozwiązanie problemu naukowego oraz wnosi nowe, ważne poznawczo dane, pogłębia naszą wiedzę na temat roli kinaz PIM w MM, wykazując ich istotny wkład zarówno w przeżycie wewnątrz guza, jak i w wsparcie mikrośrodowiska. Nie do pominięcia są przedstawione implikacje kliniczne: wskazuje na poziomy PIM (zwłaszcza PIM2 i PIM3) jako potencjalne biomarkery choroby wysokiego ryzyka i racjonalne wskazówki w stratyfikacji pacjentów pod kątem terapii ukierunkowanych na PIM.

Przygotowana dysertacja została w sposób właściwy, zarówno pod względem merytorycznym, jak i edycyjnym. Drobne uwagi, jakie posiadam do przedstawionej pracy są natury edytorskiej, np. spisu treści nie w pełni pokrywa się ze stronami poszczególnych rozdziałów. Doktorant nie ustrzegła się kilku błędów stylistycznych czy natury językowej. Kilka tych drobnych uchybień stylistycznych i tzw. literówek, które udało mi się zauważyć nie ma istotnego znaczenia dla jakości i rangi pracy.

Niepodważalne znaczenie dla wartości pracy – którą pod względem merytorycznym oceniam bardzo wysoko miała by kontynuacja dalszych badań i poznanie kolejnych obszarów z zakresu onkologii w których znalazła by zastosowanie badana przez Doktoranta cząsteczka terapeutyczna.

Wysoką wartość powyższej Dysertacji, podkreśla również fakt przedstawionych przez Doktoranta pytań i dywagacji w obszarze stratyfikacji terapii jak i pacjentów poddawanych leczeniu. Uwypukla to dojrzałość Doktoranta, jego ciekawość naukową jak też krytycyzm i rzetelność przeprowadzonych badań.

W podsumowaniu uważam, że praca doktorska lekarza medycyny Filipa Aleksandra Garbicza zatytułowana „Rola kinaz PIM w komórkach nowotworowych i mikrośrodowisku szpiczaka mnogiego” spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2018 poz. 1668). Zwracam się z wnioskiem do Rady Dyscypliny Nauk Medycznych WUM o dopuszczenie lekarza medycyny Filipa Aleksandra Garbicza do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

prof. dr hab. n. med. Maciej Borowiec

Katedra Genetyki Klinicznej i Laboratoryjnej

92-213 Łódź, ul. Pomorska 251

tel. 42 272 57 67

e-mail: katedra.genetyki@umed.lodz.pl

w4u.umed.lodz.pl/-genetyka

