

Klinika Hematologii
i Transplantacji Szpiku
UM w Lublinie

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

Dr hab. n. med. Marek Hus
Uniwersytet Medyczny W Lublinie
Klinika Hematologii i Transplantacji Szpiku

Lublin dnia 14.11.2017 r.

Ocena rozprawy doktorskiej **lek. med. Jacka Krzanowskiego**
pt. „Analiza ekspresji wybranych mikroRNA w dziecięcej ostrej białaczce limfoblastycznej z komórek B (B-ALL) z obecnością mikrodelecji genów dla czynników transkrypcyjnych”

wykonanej pod kierunkiem dr hab. n. med. Izabeli Zawlik

Rozprawa doktorska lek. med. Jacka Krzanowskiego oparta jest na analizie ekspresji komórkowej wybranych mikroRNA oraz odpowiedzi na pytanie dotyczące ich korelacji z mutacjami w wybranej grupie genów czynników transkrypcyjnych u chorych z rozpoznaniem ostrej białaczki limfoblastycznej. W pierwszym etapie badania dokonano analizy klinicznych cech przebiegu dziecięcej ostrej białaczki limfoblastycznej uwzględniając min. poziom minimalnej choroby resztkowej, początkową leukocytozę, oporność na sterydoterapię, poziom minimalnej choroby resztkowej w trakcie i po zakończeniu terapii indukującej oraz stopień zajęcia centralnego układu nerwowego. Założone cele badawcze realizowano metodami *in vitro* w oparciu o nowoczesne metody hodowli wybranych linii komórkowych ostrej białaczki limfoblastycznej oraz w próbkach RNA wyizolowanych ze szpiku kostnego chorych dzieci z wykorzystaniem dostępnych technik genetycznych (MLPA, Real Time- PCR).

Ostra białaczka limfoblastyczna (ALL) jest nowotworem z komórek prekursorowych limfocytów. Należy do najbardziej agresywnych chorób rozrostowych układu krwiotwórczego, a czas przeżycia bez odpowiedniego leczenia wynosi od kilku- do kilkunastu tygodni. ALL cechuje się dużą wrażliwością na chemioterapię i u około 90% chorych udaje się uzyskać całkowitą remisję (CR). Niestety, u prawie połowy z nich dochodzi do nawrotu choroby, który jest obarczony jednoznacznie złym rokowaniem. Stąd istotna jest wczesna identyfikacja czynników ryzyka nawrotu oraz stosowanie odpowiednio intensywnego leczenia, w uzasadnionych przypadkach z uwzględnieniem transplantacji alogenicznych krwiotwórczych komórek macierzystych (*allogeneic hematopoietic stem cell transplantation; alloHSCT*). Do konwencjonalnych czynników ryzyka nawrotu zalicza się dużą wyjściową leukocytozę ($>30 \times 10^9/l$ dla B-ALL, $>100 \times 10^9/l$ dla T-ALL), wiek >35 lat, niekorzystny podtyp immunologiczny (inny niż *common/pre-B*, korowy T), długi czas do uzyskania CR oraz niekorzystne zmiany cytogenetyczne takie jak t(9,22) czy t(4,11). Współcześnie zasadniczą wagę przypisuje się ocenie odpowiedzi na leczenie indukujące oraz konsolidujące na poziomie minimalnej choroby resztkowej (*minimal residual disease; MRD*). Uważa się, że szybka redukcja MRD, a optymalnie jej ujemny status, wiąże się z bardzo dobrym rokowaniem. Przeciwnie, w przypadku poziomu MRD $>0,1\%$ wśród komórek szpiku po leczeniu indukującym albo $>0,01\%$ w trakcie lub po zakończeniu leczenia konsolidującego ryzyko nawrotu jest bardzo duże, co implikuje konieczność zastosowania alloHSCT. Ryzyko to jest zawsze duże u chorych na OBL z t(4;11), t(9,22) czy zdefiniowanej technikami NGS całkiem niedawno grupie tzw. ALL bcr/abl like. Wszyscy oni są potencjalnie kandydatami do alloHSCT.

Od czasu odkrycia rodziny małych jednoniciowych niekodujących cząsteczek RNA (mikroRNA) w latach dziewięćdziesiątych XX wieku obserwuje się szybki postęp wiedzy, którego celem jest poznanie wpływu tych małych cząstek w regulacji wielu bardzo istotnych procesów komórkowych takich jak: rozwój, różnicowanie, proliferacja, procesy metylacji DNA, modyfikacji histonów, transkrypcji, modyfikacji procesów potranslacyjnych oraz apoptozy. Przewiduje się, że mikroRNA stanowią około 1-5% ludzkiego genomu i biorą udział w regulacji ekspresji, co najmniej 50 kluczowych dla leukemogenezy genów kontrolujących różne szlaki komórkowe i metaboliczne.

Podjęta w ocenianej pracy analiza ekspresji mikroRNA w kontekście patogenezy ostrej białaczki limfoblastycznej jest ciekawym i nowoczesnym podejściem eksperymentalnym. Propozycja skorelowania ekspresji tych krótkich cząstek z mutacjami w wybranych czynnikach transkrypcyjnych w ALL jest bardzo interesująca. Ponadto, sugestia ewentualnej możliwości wykorzystania analiz profilu mikroRNA w przewidywaniu racjonalnego przebiegu i rokowania dziecięcej ostrej białaczki B komórkowej była celem bardzo ambitnym. Postawione hipotezy badawcze są ciekawe, a ich udowodnienie może po dalszych dogłębnych analizach stanowić wartość predykcyjną i wdrożeniową. Na tej podstawie uważam wybór tematu rozprawy doktorskiej za uzasadniony.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska opracowana została w klasycznym układzie, charakterystycznym dla prac eksperymentalnych. Jest to manuskrypt zawierający 120 stron, podzielony na 12 podstawowych rozdziałów. Uzupełnienie tekstu stanowi 23 ryciny obejmujące wykresy oraz 6 tabel.

Po zapoznaniu się z pracą uważam, że stanowi ona niezwykle wartościową pozycję, głównie za sprawą jej wysokiego poziomu merytorycznego obejmującego ciekawą hipotezę badawczą oraz metody zastosowane do jej udowodnienia.

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 na tle zarówno czysto badawczym jak i w odniesieniu do uwarunkowań klinicznych. Rozdział ten umożliwia szybkie zorientowanie się w zakresie pracy oraz celowości podjęcia opisanych badań.

Wstęp rozprawy jest bardzo szczegółowym i obszernym opisem aktualnej wiedzy, obejmującym ostrą białaczkę limfoblastyczną u dzieci, jej leczenie oraz bieżące dane dotyczące mikroRNA oraz jej powiązań z tą chorobą. W rozdziale tym, Autor prezentuje znaczenie mutacji wybranych czynników transkrypcyjnych z klinicznego punktu widzenia. Zakres przedstawionych wiadomości pozwala na stwierdzenie, że Doktorant opanował teoretyczne podstawy rozwoju tej choroby jak również medyczne aspekty związane z jej leczeniem. Ciekawym aspektem tej części pracy jest również prezentacja współzależności pomiędzy najczęstszymi mutacjami czynników transkrypcyjnych i ekspresją wybranych mikroRNA a patogenezą ostrej białaczki limfoblastycznej. Umiejętność wiązania informacji z różnych dziedzin biologii z obserwacjami klinicznymi jest cennym atrybutem

wskazującym na szeroką wiedzę Doktoranta, sprawnością wykorzystania posiadanych danych jak również odpowiednim łączeniem faktów. Uważam, że wstęp rozprawy doktorskiej wyczerpująco wprowadza w problematykę podjętą w badaniach.

W celu pracy Autor prezentuje poprawnie formułowane hipotezy badawcze, wyróżniając cztery problemy badawcze, których rozwiązanie pozwoli uzyskanie precyzyjnych odpowiedzi na stawianą tezę.

Postawiony cel pracy obejmuje zróżnicowane, lecz spójne zagadnienia. Wskazuje to na bardzo dobre, wielopłaszczyznowe zorientowanie Doktoranta w zakresie zaplanowanych badań i jest odpowiednim punktem wyjścia do przeprowadzenia zaprojektowanych analiz.

Material i metody zostały opisane z dbałością o szczegóły. Opis procedur badawczych jest klarowny, pozwalający na odtworzenie przeprowadzonych badań i testów w innych ośrodkach naukowych. Metodyka, na której oparto część eksperymentalną pracy jest bardzo nowoczesna i dobrana adekwatnie do realizacji założonych celów pracy. W rozdziale tym, Autor umieścił również bardzo pomocny, prosty schemat poszczególnych reakcji MLPA, który w klarowny sposób przedstawia proces procedury badawczej. Ponadto, zostały scharakteryzowane odrębności biologiczne i molekularne komercyjnych linii komórkowych ostrej białaczki limfoblastycznej, które Doktorant wykorzystał w swoich badaniach.

Wyniki badań przedstawione zostały w formie wykresów i tabel. Moje zastrzeżenia budzi ich dość ogólny opis. Część opisową można było przedstawić bardziej dogłębnie, aniżeli obecnie, opisując istotne zmiany badanych parametrów uzyskane w trakcie realizacji części eksperymentalnej. Niemniej jednak wyniki zebrane w formie rycin, wykresów i tabel prezentują w sposób odpowiedni uzyskane obserwacje, zakres badań oraz przeprowadzoną analizę. Biorąc pod uwagę ilość przeprowadzonych eksperymentów należy wskazać na bardzo duży wkład pracy Doktoranta w realizację części badawczej rozprawy. Struktura prezentacji uzyskanych wyników podkreśla również systematyczność w dążeniu do wypełnienia postawionych celów pracy i świadomość Autora o konieczności logicznego ich zobrazowania. Uzyskane wyniki stanowią spójną całość i moim zdaniem wnoszą istotne informacje, wzbogacające wiedzę o ostrej białaczce limfoblastycznej.

W analizie uzyskanych wyników, Doktorant uwzględnił bardzo dobrze dobrane testy statystyczne, wykonana ewaluacja uzyskanych danych nie budzi zastrzeżeń.

Dyskusja stanowi bardzo obszerny fragment ocenianej rozprawy i została przeprowadzona w sposób rzeczowy zarówno w oparciu o własną wiedzę jak i informacje pochodzące z najnowszej światowej literatury, co świadczy o dojrzałości badawczej Doktoranta oraz wysoce merytorycznej opiece Promotora. W mojej ocenie Doktorant w sposób przemyślany łączy fakty i konsekwentnie stara się interpretować uzyskane wyniki mając na uwadze postawioną hipotezę badawczą. Ponadto, podział treści tego rozdziału na podrozdziały w istotny sposób ułatwia jego lekturę oraz sprawia, że jest on klarowny i usystematyzowany. Na uwagę zasługuje wykonana przez Doktoranta interpretacja uzyskanych wyników, ich trafne wytłumaczenie oraz przeprowadzenie nieschematycznych podsumowań.

Wnioski zostały zebrane i zaprezentowane w 4 punktach. Oparte są one w pełni na uzyskanych wynikach wskazując, które z nich stanowią najistotniejsze osiągnięcia rozprawy doktorskiej. Wykonane podsumowanie jest zwięzłe zawierające ogólne spostrzeżenia jak również sugestie Autora dotyczące potencjalnej możliwości praktycznego wykorzystania uzyskanych wyników w diagnostyce i terapii chorych na ALL.

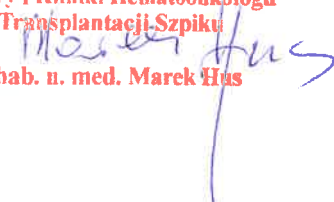
Piśmiennictwo obejmuje 192 pozycji, odpowiednio dobranych. Literatura jest aktualna i związana z zakresem badań podjętych w pracy doktorskiej.

Podsumowując, stwierdzam, że Doktorant w pełni wypełnił zadania, jakie zostały postawione w celu pracy. Istotnym osiągnięciem ocenianej dysertacji jest wstępna odpowiedź na pytanie dotyczące wielowątkowego i trudnego problemu obejmującego wzajemne relacje między ekspresją mikroRNA, mutacjami analizowanych czynników transkrypcyjnych a biologią oraz wynikami leczenia ALL u dzieci. Doktorant wykazał bardzo dobre zorientowanie w aktualnych doniesieniach literatury światowej dotyczącej zaplanowanych badań, na co wskazuje przemyślany wstęp i dojrzała dyskusja. Interpretacja wyników jest odpowiednia jak również na uznanie zasługuje umiejętność powściągliwego i odpowiedzialnego wyprowadzenia wniosków. Niezwykle ciekawym aspektem przeprowadzonych badań, na które również wskazał Autor, jest ich potencjalna możliwość wykorzystania w stratyfikacji ryzyka w ALL.

Pracę oceniam wysoko z uwagi na ambitny cel oraz sumienną i konsekwentną jego realizację.

Rozprawa doktorska lekarz med. Jacka Krzanowskiego jest opracowaniem spełniającym wszystkie warunki wymagane odpowiednią ustawą dla dysertacji doktorskich. Praca ma charakter poznawczy i niewątpliwie posiada ciekawe implikacje kliniczne. Stanowi również podstawę do dalszych badań laboratoryjnych i klinicznych.

Mam zaszczyt przedstawić Wysokiej Radzie Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi wysoce pozytywną recenzję i wnioskować o dopuszczenie lekarz med. Jacka Krzanowskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

KIEROWNIK
Katedry i Kliniki Hematoonkologii
i Transplantacji Szpiku

dr hab. n. med. Marek Hus