

## Recenzja rozprawy doktorskiej lek.med. Jacka Krzanowskiego

„Analiza ekspresji wybranych mikroRNA w dziecięcej ostrej białaczce limfoblastycznej z komórek B (B-ALL) z obecnością mikrodelecji genów dla czynników transkrypcyjnych”

Praca w całości powstała i została zrealizowana w uznanym ośrodku, tj. w Klinice Pediatrii, Onkologii, Hematologii i Diabetologii Katedry Pediatrii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi kierowanej przez prof. dr hab. n. med. Wojciecha Młynarskiego, gdzie realizowane są projekty wieloośrodkowe z wykorzystaniem najnowszych technik genetycznych. Bezpośrednim opiekunem projektu badawczego będącego podstawą rozprawy doktorskiej jest dr hab. n. med. Izabela Zawlik. Protokół badania został pozytywnie zaopiniowany przez Komisję Bioetyki Uniwersytetu Medycznego w Łodzi i jest zgodny z Deklaracją Helsińską.

Hipoteza badawcza powstała w wyniku obserwacji świadczących o znaczeniu mikrodelecji genów czynników transkrypcyjnych w patogenezie, przebiegu i rokowaniu ostrej białaczki limfoblastycznej, najczęściej występującego nowotworu w wieku dziecięcym, będącego również najczęstszą przyczyną zgonów. Wprawdzie obecnie dzięki wystandaryzowanym i zoptymalizowanym protokołom terapeutycznym 5-letnie przeżycie osiąga około 80% pediatrycznych pacjentów, to wciąż problemem pozostaje znacząca grupa chorych z oporną na chemioterapię postacią choroby oraz z wysokim odsetkiem nawrotów, w tym w ośrodkowym układzie nerwowym, kończących się często niepowodzeniem. Dlatego m.in. identyfikacja zaburzeń mikroRNA u poszczególnych pacjentów z ALL pozwoli ich z dużą precyzją stratyfikować do grup ryzyka z określeniem prawdopodobieństwa wystąpienia nawrotów i niepowodzeń terapeutycznych. Uzyskane informacje dotyczące implikacji klinicznych i prognostycznych umożliwiają w konsekwencji zastosowanie indywidualizowanej terapii, najbardziej optymalnej dla danego pacjenta. Przesłanki te

były podstawą badań będących przedmiotem dysertacji, opracowanej przez doktoranta – klinicystę, dobrze rozumiejącego ten aspekt projektu badawczego.

Cel badania został ujęty w czterech punktach, z których trzy dotyczyły określenia zaburzeń ekspresji wyselekcjonowanych cząsteczek mikroRNA z uwzględnieniem statusu mikrodelecji genów czynników transkrypcyjnych oraz analizy ich wpływu na przebieg i rokowanie ALL. Czwarty punkt dotyczył oceny ekspresji wyselekcjonowanych cząsteczek mikroRNA w liniach komórkowych ostrej białaczki limfoblastycznej.

Aby ten ambitny cel osiągnąć, doktorantowi umożliwiono korzystanie nie tylko z bardzo nowoczesnych narzędzi badawczych, stosowanych w uznanej placówce, ale również z materiału, będącego wynikiem współpracy łącznie 10 ośrodków onkologii pediatrycznej działających w ramach Polskiej Pediatrycznej Grupy ds. Leczenia Białaczek i Chłoniaków (PPGLBiC). Grupę badaną stanowiło 90 dzieci z ostrą białaczką limfoblastyczną, w tym 66 (73,33%) przypadków B-ALL i 24 przypadki (26,67%) T-ALL leczonych w latach 2007-2014 według wystandaryzowanych protokołów rekomendowanych przez PPGLBiC ALL-IC BFM 2002 oraz ALL-IC BFM 2009; odpowiednio  $n=43$  (47,78%) i  $n=47$  (52,22%).

Dobór materiału i zastosowanych metod, biorąc pod uwagę najwyższą referencyjność ośrodka, gdzie projekt realizowano, stawiam poza wszelką dyskusją. Na szczególną uwagę zwracam bardzo klarowny, obejmujący 8 punktów wykaz konsekwentnie przeprowadzonych etapów badawczych, które w konsekwencji doprowadziły do uzyskania wyników, przedstawionych niezależnie od formy opisowej w postaci 3 tabel i 15 rycin. Należy docenić umieszczenie wyników w formie graficznej wśród ich części opisowej a nie na końcu rozprawy, co z pewnością było utrudnieniem dla doktoranta. Taka wersja edycyjna pracy, logiczna z punktu widzenia czytającego, umożliwia jej wnikliwą analizę i ułatwia recenzowanie.

Uzyskane wyniki zostały sformułowane w formie czterech wniosków stanowiących odpowiedź na zadane cele pracy, z których najważniejsze konkluzje można streścić następująco.

- wykazano różnice w ekspresji miR-542 oraz miR-708 w zależności od podtypu ostrej białaczki limfoblastycznej
- obniżona ekspresja miR-31 oraz miR-708 wiąże się z niekorzystnym rokowniczo wyższym poziomem minimalnej choroby resztkowej

- poziom ekspresji czterech wyselekcjonowanych *in silico* cząsteczek mikroRNA wykazał związek z delecjami czynników transkrypcyjnych u dzieci z B-ALL, co może sugerować udział miR-128, miR-31 oraz miR-708 w kształtowaniu biologii tego podtypu białaczki
- różnica w ekspresji badanych mikroRNA linii komórkowych ostrej białaczki limfoblastycznej BCR/ABL1 dodatkowo może wynikać z genezy linii oraz odmiennego profilu mutacji czynników transkrypcyjnych w tych liniach.

Niezależnie od bardzo wysokiej wartości merytorycznej, pragnę podkreślić, że przedłożona mi do recenzji dysertacja doktorska jest przykładem wyjątkowo starannie pod każdym względem napisanej rozprawy obejmującej łącznie 120 stron. Zawiera układ typowy dla tego typu monografii obejmujący wymagane rozdziały z adekwatnie umieszczonymi w nich 6 tabelami i 23 rycinami. Doktorant, niezależnie od dużego wkładu pracy oraz, jak podkreśliłam wcześniej, udostępnionego warsztatu badawczego o najwyższej referencyjności, wykazał się bardzo dobrą znajomością zagadnień będących przedmiotem badań, które należą do niezwykle trudnych. W tym celu m.in. korzystał z piśmiennictwa liczącego 192 pozycje i pochodzącego z ostatnich lat, ponieważ zagadnienia dotyczące badań nad mikroRNA w onkohematologii są nowe. O nowatorskim charakterze pracy świadczy fakt, że jedyna, krajowa publikacja dotycząca zagadnień będących przedmiotem dysertacji doktorskiej, pochodzi z ośrodka, w którym realizowany był projekt badawczy. Publikacja ta, umieszczona w pozycji 59, wymaga jednak skorygowania, ponieważ w jej prezentacji dopatrzyłam się błędów natury redakcyjnej. Ponadto z niezrozumiałych dla mnie względów pozycje piśmiennictwa 13, 15, 16, 19, 21, 22, 39 zawierają treści pisane różnymi czcionkami, co traktuję również jako uchybienie redakcyjne nie mające znaczenia dla mojej bardzo wysokiej oceny pracy.

Z uwag, które przedstawiam do rozważenia zarówno doktorantowi jak i promotorowi przy opracowywaniu końcowej, edycyjnej wersji pracy, to skrócenie wniosków poprzez przeniesienie zawartych w nich niektórych treści do rozdziału wyniki, którym 'de facto' odpowiadają. Tym sposobem można byłoby rozszerzyć część opisową wyników, która w obecnej wersji budzi mój pewien niedosyt. Ponadto do rozważenia pozostawiam tytuł pracy proponując pominięcie sformułowania 'z komórek B (B-ALL)', bowiem badania dotyczą również podtypu T-ALL. To, że

pojedynczych badań nie udało się wykonać w tej grupie ze względu na jej małą liczebność, nie oznacza, że można ją pominąć. Z ostrożności świadczącej o dojrzałości badacza podkreślane są potrzeby dalszych badań obejmujące większe kohorty pacjentów, z czym się w pełni zgadzam. Być może, można byłoby też uwzględnić analizy porównawcze uzyskanych wyników zależnie od stosowanych programów terapeutycznych; tym bardziej, że obejmują one prawie równe grupy chorych. Tym sposobem można byłoby pokusić się o analizę, jeśli nie teraz, to w przyszłości uwzględniającą ew. wpływ rodzaju terapii na uzyskiwane wyniki. Zdaję sobie sprawę z tego, że uwagi te są dyskusyjne i dlatego proszę je traktować jako dodatkowe, niezależne od mojej opinii, która jest jednoznacznie pozytywna, podkreślająca oryginalny charakter badań oraz ich bardzo wysoką wartość naukową jak również aspekt praktyczny, których wyniki mogą okazać się bezcenne do wykorzystania w personifikowanej medycynie.

Mam zaszczyt przedstawić Wysokiej Radzie wniosek o dopuszczenie lek. med. Jacka Krzanowskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ze względu na bardzo oryginalny i nowatorski charakter badań stawiam również wniosek o wyróżnienie rozprawy doktorskiej.

Prof. dr hab. n. med.  
**Stawomir Kyrez-Krzemiński**  
specjalista chorób wewnętrznych  
hematologii, immunologii klinicznej  
i trasplacologii klinicznej  
2713387