



KATEDRA I KLINIKA PEDIATRII, HEMATOLOGII I ONKOLOGII
UNIwersytet MIKOŁAJA KOPERNIKA W TORUNIU
COLLEGIUM MEDICUM IM. L. RYDYGIERA W BYDGOSZCZY

KIEROWNIK: PROF. DR HAB. N. MED. MARIUSZ WYSOCKI

85-094 BYDGOSZCZ • UL. M. SKŁODOWSKIEJ-CURIE 9 • TEL. (052) 585-4860 • TEL./FAX (052) 585-4867 • KLHEMONK@CM.UMK.PL

Bydgoszcz, dnia 6.05.19

Ocena

rozprawy doktorskiej magister biotechnologii medycznej Joanny Madzio
**„GATA3 jako marker stratyfikacji ryzyka niepowodzenia terapii u dzieci
z ostrą białaczką limfoblastyczną (ALL)”**

Obserwowana w ostatnich 50 latach, w onkolhematologii dziecięcej wybitna poprawa wyników leczenia jest między innymi wynikiem postępu jaki dokonał się w terapii ostrej białaczki limfoblastycznej (ALL), gdyż choroba ta stała się modelem postępowania dla wielu innych nowotworów. W chwili obecnej szanse na trwałe wyleczenie ma około 90% dzieci chorych na ostrą białaczkę limfoblastyczną. Początkowo było to możliwe dzięki wprowadzeniu efektywnej skojarzonej chemioterapii podawanej przez okres 2 – 3 lat, skutecznemu zapobieganiu jak i leczeniu białaczki ośrodkowego układu nerwowego oraz poprawie leczenia wspomagającego. W kolejnym etapie, odkrycie, że ostra białaczka limfoblastyczna to biologicznie zróżnicowana grupa chorób wraz z wprowadzeniem monitorowania minimalnej choroby resztkowej (MRD) pozwoliło dopracować – udoskonalić leczenie w oparciu o czynniki ryzyka wznowy tak aby zmaksymalizować szanse na wyleczenie przy zminimalizowaniu toksyczności. Nadal mamy fragmentaryczną wiedzę, dlaczego u dziecka rozwija się określony podtyp białaczki jak również mamy ograniczoną wiedzę czy genetyczne/molekularne zaburzenia mają prognostyczne znaczenie.

Pomimo znakomych wyników leczenia, u 10 – 20% dzieci dochodzi do nawrotu choroby i ponownego zagrożenia życia. Przyczyny niepowodzenia leczenia pierwszej linii terapii są złożone.

Dalszej poprawy wyników leczenia upatruje się między innymi w lepszym poznaniu procesu powstawania białaczki, co pozwoli zidentyfikować na poziomie submikroskopowym nowe molekularne podtypy białaczki cechujące się gorszym rokowaniem, zwiększonym ryzykiem nawrotu/wznowy choroby. W tym zakresie w ostatnich latach dokonał się znaczący postęp wiedzy odnośnie czynników regulujących rozwój, różnicowanie i funkcję limfocytów T. Do takich regulujących czynników należy czynnik transkrypcyjny GATA3, który także bierze udział w powstawaniu białaczki T – komórkowej, ale jego rola w rozwoju poszczególnych podtypów białaczki z linii B – ALL jest w niewielkim stopniu poznana. Poznanie mechanizmów powstawania białaczki w poszczególnych podtypach ALL wraz z ich klinicznym znaczeniem powinno przyczynić się do dalszej poprawy wyników leczenia i zrealizować marzenie onkologów dziecięcych o 100% wyleczalności w ostrej białaczkę limfoblastycznej. Rozprawa doktorska mgr Joanny Madzio wpisuje się w ten nurt badań.

Praca doktorska pani mgr Joanny Madzio poprzedzona jest wstępem i podzielona merytorycznie na 6 rozdziałów i zawiera 104 strony.

Tytuł rozprawy doktorskiej jest zwięzły, ale w mojej opinii zbyt zawężony – pomija niezwykle ważną część rozprawy wnikającą w proces leukemogenezy.

W zwartym 13 stronicowym wstępie doktorantka dokonała przeglądu wiedzy odnośnie ostrej białaczki limfoblastycznej u dzieci. Lapidarnie scharakteryzowała tę jednostkę chorobową od strony klinicznej – podziału białaczek, patogenezy, a także podłoża genetycznego, powiązanego ze znaczeniem klinicznym - rokowniczym. W dalszej części wstępu doktorantka słusznie skupiła się na zagadnieniach związanych ze szczególnym podtypem białaczki – Ph – like ALL, podkreślając, że dzieci z tym podtypem nowotworu mają niepomyślne rokowanie. W tym kontekście, w kolejnych sekcjach rozprawy bardzo dobrze scharakteryzowała czynnik transkrypcyjny GATA3, jego rolę w regulacji rozwoju i różnicowaniu komórek hematopoetycznych. Doktorantka formułuje hipotezę, że należy intensywnie poszukiwać markerów umożliwiające ocenę ryzyka wznowy już w chwili rozpoznania choroby i sugeruje, że takim markerem może być czynnik transkrypcyjny GATA3. Tym samym uzasadnia podjęcie badań wiążących zmienność genetyczną czynnika transkrypcyjnego GATA3 z patogenezą i przebiegiem klinicznym ostrej białaczki limfoblastycznej u dzieci. Doktorantka analizując piśmiennictwo, spostrzegła lukę w wiedzy odnośnie procesu leukemogenezy. Cytuję „nie wiemy, jak wzrost ekspresji GATA3 kieruje linię limfoidalnych progenitorów na drogę leukemogenezy”. Aby podjąć się odpowiedzi na to pytanie zaprojektowała własny oryginalny model komórkowy..

Wstęp jest okraszony 5 cioma klarownymi rycinami, które ułatwiają percepcję tematu. Rozdział ten stanowi syntetyczne wprowadzenie do badań własnych doktorantki.

Cele pracy zostały sformułowane jasno i wystarczająco szczegółowo i są ważne nie tylko z poznawczego, ale także potencjalnie praktycznego – klinicznego punktu widzenia. Dotyczą one oceny związku zmienności GATA3 z profilem genetycznym oraz fenotypem białaczki u dzieci leczonych z powodu BCP-ALL oraz oceny skutków nadaktywności tego genu w liniach komórkowych.

Takie formułowanie celów pracy o walorach poznawczych z implikacjami klinicznymi ma także potencjalnie praktyczny wymiar i bardzo dobrze świadczy o doktorantce.

W rozdziale „Materiały i metody” doktorantka wyróżniła 2 składowe swojej rozprawy: część kliniczną i eksperymentalną. Odnośnie części klinicznej to autorka bardzo dobrze scharakteryzowała pacjentów względem danych demograficznych jak i w zależności od stopnia zaawansowania schorzenia podstawowego – stratyfikacji ryzyka wznowy. Grupa badana odpowiednio liczna - 861 dzieci z nowo rozpoznaną ostrą białaczką limfoblastyczną, leczonych ujednoliconymi protokołami ALL IC-BFM 2002 (n=216) oraz ALL IC-BFM 2009 (n=645) w 10 ośrodkach Onkologii i Hematologii Dziecięcej w Polsce w okresie od sierpnia 2003 do czerwca 2016. Odnośnie części eksperymentalnej to konstrukcja oryginalnego modelu komórkowego z nad ekspresją genu GATA3 jest wzorowa.

Metodologia badań genetycznych, molekularnych jest nowoczesna i właściwa do zamierzonych celów. Część wyników badań takich jak profil cytogenetyczny, analiza ekspresji białka CRLF2 czy oznaczanie minimalnej choroby resztkowej pochodziła z krajowych ośrodków referencyjnych. Wektor wirusowy pMIG-IRES-GFP został udostępniony dzięki uprzejmości profesora Przemysława Juszczyńskiego, kierownika Pracowni Hematologii Doświadczalnej, Instytutu Hematologii i Transfuzjologii w Warszawie. Zaś oznaczenie immunofenotypu komórek Ba/F3 zostało przeprowadzone metodą cytometrii przepływowej w Zakładzie Immunologii Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego, dzięki uprzejmości pani dr n. biol. Małgorzaty Firczuk. Profilowanie ekspresji genów wyindukowanej nadaktywnością GATA3 zostało przeprowadzone macierzami Mouse GeneChip™ w ramach usługi w zewnętrznym laboratorium Pracowni Analiz Mikromacierzy, Instytutu Biochemii i Biofizyki w Warszawie. Wszystko to razem wskazuje na to iż doktorantka poszukiwała jakości i głębi w swoich badaniach wykazując się przy tym niezwykłą zdolnością do współpracy.

Podsumowując, ten rozdział zawiera wystarczającą ilość precyzyjnych informacji, co umożliwia przeprowadzenie podobnych analiz w innych ośrodkach.

W rozdziale "Wyniki" doktorantka przeprowadziła wnikliwą analizę uzyskanych wyników badań i przedstawiła ich syntezę w postaci tekstowej jak i w 9 klarownych tabelach i na 20 wykresach.

W części klinicznej analizy doktorantka wykazała, że pacjentów z geotypem AA w locus rs3824662 genu *GATA3*, można scharakteryzować jako starszych w chwili diagnozy, gorzej odpowiadających na leczenie oraz mających wyższe ryzyko zgonu. W zakresie somatycznych zaburzeń genetycznych obserwowanych w ALL, u nosicieli genotypu AA częściej występują delecje w genie *IKZF1*, delecja *IL3R-P2RY8* oraz wyższa ekspresja *GATA3* i *CRLF2*. Warto też zauważyć, że efekt wariantu ryzyka AA na odpowiedź na leczenie oraz przeżycie pacjentów, okazał się niezależnym od znanych markerów złej prognozy.

W modelu komórkowym, na podstawie wyników profilowania ekspresji całego transkryptomu, oraz ścieżek sygnałowych zidentyfikowanych przez STRING DB, doktorantka scharakteryzowała profil *GATA(+)* jako zaangażowany w przekaźnictwo sygnału wewnątrzkomórkowego, aktywność układu immunologicznego i szlak hematopoezy oraz związany z nowotworzeniem. Takie obserwacje świadczą o tym, że zmiany transkryptomu, jakie wywołuje nadekspresja czynnika transkrypcyjnego *GATA3* w komórkach prekursorowych linii B, mogą mieć udział w leukemogenezie.

Podsumowując przedstawione wyniki logicznie powiązanych analiz odpowiadają na pytania sformułowane w celach pracy i świadczą o dojrzałości doktorantki i poznawczej pasji naukowej. Dobór metod statystycznych do oceny wyników badań uważam za bardzo dobry. Dokumentacja naukowa jest przekonująca.

Doktorantka w rozdziale „Dyskusja” nie odbiegając od tematu, bardzo zręcznie i dojrzałe konfrontuje wyniki badań własnych z doniesieniami innych autorów. Doktorantka ze znanstwem i swobodą porusza się zarówno na polu klinicznym jak i na genetycznym. Ma świadomość, że zaletą pracy są analizy wieloczynnikowe, które podkreślają istotność genotypu i jego związek z przeżyciem, niezależnie od protokołu leczenia, grupy ryzyka oraz obecności defektów somatycznych w komórkach nowotworowych pacjentów. Jednocześnie ma świadomość, że brak profilowania ekspresji genów Ph-like jest głównym ograniczeniem pracy. Doktorantka, sugeruje, że chorzy na BCP-ALL z nadaktywnością *GATA3*, mogą odnieść korzyści kliniczne z leczenia inhibitorami kinazy tyrozynowej (np. Ruksolitinib). W dyskusji zabrakło mi rozważań odnośnie konsekwencji nadekspresji czynnika transkrypcyjnego *GATA3* w komórkach innych nowotworów.

Wnioski wynikające z przeprowadzonych badań są merytorycznie słuszne, ostrożnie sformułowane i odpowiadają na problemy postawione w rozdziale "Cel pracy".

Praca napisana jest zwięźle, poprawną polszczyzną. Pomimo trudnego tematu rozprawę czyta się przyjemnie i wartko. Piśmiennictwo w łącznej liczbie 150 pozycji jest odpowiednio dobrane i wykorzystane w pracy. Szata graficzna rozprawy staranna. Praca zawiera również podziękowania dla osób wspierających doktorantkę radą czy inną formą pomocy, co ponownie świadczy o jej dojrzałości.

Na podkreślenie zasługuje to, że praca została sfinansowana z projektów badawczych Narodowego Centrum Nauki, Narodowego Centrum Badań i Rozwoju oraz grantu Uniwersytetu Medycznego w Łodzi.

Podsumowując, doktorantka o temperamencie eksperymentatora bardzo dobrze zaplanowała i konsekwentnie przeprowadziła pracochłonne oryginalne badania o charakterze poznawczym jak i o potencjalnych implikacjach praktycznych. Szczególnie wartościowym jest uwzględnienie fenotypu białaczki, dostępnych parametrów diagnostycznych oraz wyników leczenia. Rozprawa może być także wskazówką do dalszych ukierunkowanych poszukiwań nowych podtypów białaczki.

Stwierdzam, że przedłożona mi do oceny rozprawa doktorska magister biotechnologii medycznej Joanny Madzio pt.: „GATA3 jako marker stratyfikacji ryzyka niepowodzenia terapii u dzieci z ostrą białaczką limfoblastyczną (ALL)” stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego. Uważam, że doktorantka wykazała się ogólną wiedzą teoretyczną w zakresie medycyny i biotechnologii medycznej, umiejętnością samodzielnego prowadzenia pracy naukowej i tym samym spełnia ustawowe wymogi stawiane tego typu pracom i dlatego wnoszę do Rady Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi o dopuszczenie doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie, ze względu na bardzo wysoką wartość poznawczą pracy opartej o bardzo nowoczesny warsztat badawczy wnoszę do Wysokiej Rady o wyróżnienie rozprawy.

prof. dr hab. med. Mariusz Wysocki