

RECENZJA

Rozprawy doktorskiej lek. Edyty Ulińskiej

Ocena aktywności i ekspresji kinazy mTOR w blastach oraz jej wpływu na przebieg kliniczny ostrej białaczki limfoblastycznej B-komórkowej u dzieci

Zgodnie z uchwałą Rady I Wydziału Lekarskiego Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego z dnia 6 czerwca 2018 roku o powołaniu mnie na recenzenta wyżej wymienionej rozprawy, mam zaszczyt przedstawić poniższą opinię.

Oceniając przedłożoną mi rozprawę na stopień doktora nauk medycznych, dokonam jej charakterystyki w zakresie:

1. wartości celu badawczego
2. poprawności metodycznej
3. redakcji przedłożonej pracy
4. znaczenia klinicznego i praktycznego wniosków wynikających z przeprowadzonych analiz.

1. Wartość celu badawczego

Wyniki badań naukowych nad ostrą białaczką limfoblastyczną (ALL) u dzieci w ostatnich dziesięcioleciach wykazały, że jest to choroba bardzo różnorodna nie tylko klinicznie, ale również pod względem procesów genetycznych i molekularnych zachodzących w komórkach białaczkowych. Jednym z potencjalnych mechanizmów onkogenezy białaczkowej może być zwiększona aktywność kinazy białkowej treoninowo-serynowej mTOR. Szlak PI3K/AKT/mTOR jest kluczowy dla kontroli proliferacji, różnicowania, wzrostu i przeżycia komórek. Zbadanie aktywności i ekspresji kinazy mTOR w ALL z komórek prekursorowych limfocytów B (BCP-ALL) oraz jej wpływu na przebieg kliniczny białaczki stało się przedmiotem ocenianej rozprawy doktorskiej.

We Wstępie Doktorantka w sposób dokładny omówiła najpierw biologię BCP-ALL w kontekście stwierdzanych aberracji genetycznych i molekularnych. Następnie sposób bardzo dokładny scharakteryzowała obowiązujące protokoły leczenia ALL u dzieci. Kolejny

fragment wstępu poświęcony jest kinazie mTOR i związanej z nią szlakom sygnałowym. Zaburzenia prowadzące do nadmiernej aktywacji białek ścieżki PI3K/mTOR opisywane były w licznych nowotworach litych, rzadziej w nowotworach hematologicznych, w tym w ALL. Z tego i innych fragmentów Wstępu wynika niezbicie, że Doktorantka jest bardzo dobrze zaznajomiona z tematyką wykonywanych badań.

Lekarz Edyta Ulińska na podstawie podsumowanych we Wstępie informacji na temat roli kinazy mTOR w procesach onkogenezy, postawiła sobie następujące cele pracy:

1. Analiza ekspresji białka mTOR oraz jej aktywności w zakresie kompleksu mTORC1 w blastach BCP-ALL u dzieci;
2. Ocena, czy istnieje korelacja pomiędzy aktywnością kompleksu mTORC1, a przebiegiem klinicznym oraz rokowaniem w dziecięcej BCP-ALL;
3. Porównanie aktywności i ekspresji kinazy mTOR w blastach pierwszego zachorowania na dziecięcą BCP-ALL oraz w komórkach nowotworowych przy wznowie choroby;
4. Określenie, czy analiza aktywności kinazy mTOR w blastach BCP-ALL u dzieci może nieść za sobą implikacje kliniczne.

Cele te mieszczą się w trendzie nowoczesnych strategii badawczych we współczesnej Europie.

2. Poprawność metodyczna

2.1 Materiał i metody

Badanie przeprowadzono w grupie 68 pacjentów z BCP-ALL leczonych według Protokołów ALLIC-BFM 2002 lub ALLIC-BFM 2009 w Klinikach Hematologii i Onkologii Dziecięcej w Warszawie i w Łodzi. Ze względu na retrospektywny charakter i resztkowy charakter materiału badawczego, badania nie wymagały dodatkowej zgody Komisji Bioetycznej (potwierdzone przez Przewodniczącą Komisji Bioetycznej przy Warszawskim Uniwersytecie Medycznym). Analizie retrospektywnej pod kątem ekspresji i aktywności kinazy mTOR poddano łącznie 86 preparatów rozmazowych szpiku kostnego, od wszystkich 68 pacjentów w dniu rozpoznania BCP-ALL oraz dodatkowo od 17 pacjentów w chwili rozpoznania wznowy ALL z zajęciem szpiku kostnego, a także od 1 pacjenta w momencie diagnozy transformacji BCP-ALL w AML. Analizę przeprowadzono dla dwóch grup pacjentów. Grupę badaną stanowiło 20 pacjentów z BCP-ALL, u których do końca 2015 r. wystąpiło niekorzystne zdarzenia w postaci nawrotu pierwszej choroby, albo drugiego

nowotworu układu krwiotwórczego, a grupę kontrolną stanowiło 45 kolejnych chorych z BCP-ALL pozostających w pierwszej remisji. Grupy pacjentów zostały dobrze scharakteryzowane pod względem klinicznym. U wszystkich badanych dzieci dokonano analizy całkowitej ekspresji kinazy mTOR na poziomie białka w blastach BCP-ALL. Ponadto oceniano jej aktywność w zakresie kompleksu mTORC1 poprzez oznaczenie ekspresji ufosforylowanej postaci mTOR w miejscu Ser 2448 i ekspresji białka S6rp ufosforylowanego w miejscu Ser235/236 za pomocą odpowiednio dobranych technik immunocytochemicznych. W analizach zbadano, czy istnieje zależność pomiędzy ekspresją i aktywnością białka mTOR oraz parametrami klinicznymi takimi jak: płeć pacjenta, wiek w momencie rozpoznania, wysokość wstępnej leukocytozy, odpowiedź na zastosowane leczenie indukcyjne (odpowiedź na sterydy w ósmej dobie oraz odpowiedź na leczenie w 15. i 33. dobie terapii), grupa ryzyka ustalona wg obowiązującego protokołu leczenia, koekspresja antygenów linii mieloidalnej na komórkach blastycznych oraz obecność niektórych aberracji genetycznych w blastach. Metodyka badań została opisana w sposób staranny i szczegółowy. Spełnia ona kryteria dobrej praktyki diagnostycznej i klinicznej. Analizę statystyczną przeprowadzono z zastosowaniem adekwatnych testów statystycznych.

2.2 Wyniki

Wyniki zostały przedstawione w sposób szczegółowy i staranny. Doktorantka najpierw dokładnie scharakteryzowała grupę pacjentów, wykazując, że spośród wszystkich zmiennych klinicznych uwzględnionych w analizie, jedynie stratyfikacja pacjentów do grup ryzyka wpływała w sposób istotny statystycznie na krzywe przeżycia wolnego od niekorzystnych zdarzeń. Jeśli chodzi o ekspresję białka mTOR, Doktorantka stwierdziła ją u 33 spośród wszystkich 68 pacjentów (48,5%) przy pierwszym rozpoznaniu BCP-ALL. Ekspresję białka mTOR wykazano u 16 spośród 45 (35,5%) dzieci żyjących w I remisji, u 2 spośród 3 chorych zmarłych w trakcie leczenia pierwszego rzutu choroby oraz u 14 spośród 19 (73,7%) dzieci, które w późniejszym okresie rozwinęły wznowę ALL, jak również u pacjentki, u której doszło do transformacji w AML. Ekspresję p-mTOR (Ser2448) stwierdzono jedynie u 9 pacjentów z nowo-rozpoznaną BCP-ALL, przy czym u wszystkich tych chorych leczenie zakończyło się niepowodzeniem (8 rozwinęło wznowę ALL, u jednego doszło do transformacji BCP-ALL w AML). Ekspresję białka p-S6rp (Ser235/236) wykazano u 22 z 65 (33,8%) dzieci z nowo-rozpoznaną BCP-ALL, w tym tylko u 8 z 43 pacjentów żyjących w I remisji (18,6%), oraz aż u 13 spośród 18 pacjentów, u których doszło do wznowy BCP-ALL (72,2%), a także u dziecka, u którego doszło do transformacji BCP-ALL w AML. Oceniając korelację

pomiędzy całkowitą ekspresją białka mTOR w blastach, a ryzykiem wystąpienia niekorzystnych zdarzeń, Doktorantka wykazała, że u pacjentów, z niekorzystnym przebiegiem BCP-ALL, ekspresja całkowita białka mTOR przy rozpoznaniu choroby, była istotnie wyższa, w porównaniu do pacjentów pozostających w I remisji. Wykrycie ekspresji białka mTOR u pacjentów z BCP-ALL, wiązało się w sposób istotny statystycznie z obniżeniem prawdopodobieństwa przeżycia wolnego od niekorzystnych zdarzeń. Nawrót dziecięcej BCP-ALL wiązał się ze wzrostem aktywności kinazy mTOR w odniesieniu do pierwszego rozpoznania choroby, co Doktorantka wiązała z większym potencjałem proliferacyjnym oraz lekoopornością blastów we wznowie.

Podsumowując, Doktorantka wykazała, że aktywność mTOR różni się u poszczególnych pacjentów, korelując istotnie z ryzykiem nawrotu BCP-ALL, oraz jest wyższa przy wznowie, niż przy pierwszym rozpoznaniu choroby. Doktorantka nie stwierdziła natomiast statystycznie istotnego związku pomiędzy aktywnością białka mTOR, a innymi uznanymi czynnikami niekorzystnego rokowania oraz pozostałymi podstawowymi danymi klinicznymi. Bardzo interesujący jest końcowy wniosek Doktorantki, iż aktywność mTOR w blastach BCP-ALL u dzieci, może być rozpatrywana jako niezależny czynnik złego rokowania, a rutynowa ocena aktywności mTOR mogłaby stanowić podstawę do wyodrębnienia pacjentów o niekorzystnej prognozie, którzy mogliby potencjalnie odnieść korzyść z terapii inhibitorami kinazy mTOR.

3. Redakcja przedłożonej pracy

Rozprawę rozpoczyna spis treści; następnie typowy układ: wykaz rycin: str. 1-4; wykaz tabel: str. 5-7; wykaz najważniejszych skrótów: str. 8-16; streszczenie w języku polskim: str. 17-19; streszczenie w języku angielskim: str. 20-22; wstęp: str. 23-55; cele pracy: str. 56; materiał i metody: str. 57-69; wyniki: str. 70-131; dyskusja: str. 132-153; wnioski: str. 154 i aneks z Oświadczeniem Komisji Bioetycznej. W pracy umieszczono 31 tabel i 44 ryciny. Piśmiennictwo (str. 155-165) zawiera 101 pozycji, w tym 99 w języku angielskim i 31 z ostatniego pięciolecia. Praca napisana jest poprawną polszczyzną i ma bardzo staranną szatę graficzną.

4. Wartość kliniczna i praktyczna wniosków wynikających z przeprowadzonych analiz.

W dyskusji Doktorantka odnosi swoje wyniki do danych z piśmiennictwa światowego. Bazując na swoich doświadczeniach i nielicznych danych z piśmiennictwa słusznie

konkluduje, że zarówno ekspresja kinazy mTOR, jak i aktywacja kompleksu mTORC1 wykazują znacznego stopnia heterogenność w grupie dzieci chorych na BCP-ALL i tylko w części przypadków tej choroby szlak mTORC1/p-S6rp odgrywa zauważalną rolę w procesie leukemogenezy. Ponieważ ekspresja białka mTOR, a w szczególności aktywność szlaku mTORC1/p-S6rp w blastach, korelują istotnie z ryzykiem wznowy BCP-ALL przy obecnie stosowanym leczeniu, terapeutyczne zahamowanie tego szlaku może stanowić opcję eksperymentalną dla pacjentów po wznowie choroby. Doktorantka dokładnie podsumowała, szereg badań klinicznych I i II fazy analizujących działanie leków hamujących aktywność szlaku mTOR w BCP-ALL, ukazując potencjalną skuteczność inhibitorów mTOR u niektórych pacjentów, co wg Doktorantki stanowi uzasadnienie do dalszych badań w tym kierunku. Doktorantka podkreśla zasadność dokładnej analizy aktywności mTORC1 oraz poznanych interferujących ścieżek transdukcji sygnału w blastach u poszczególnych pacjentów z BCP-ALL, celem właściwego doboru ewentualnych leków celowanych w tak heterogenicznej pod względem zaburzeń molekularnych i genetycznych grupie chorób.

Sformułowane cztery wnioski stanowią wyczerpującą odpowiedź na postawione cele i zadania badawcze. Jak słusznie Doktorantka konkluduje, ze względu na niewielką grupę pacjentów poddanych ocenie, a także ograniczony zakres przebadanych białek szlaku kinazy mTOR, wnioskowi tym należy przypisywać charakter wstępny. Wymagają one potwierdzenia na większej grupie chorych oraz uzupełnienia o równoległą ocenę ekspresji mTOR na poziomie RNA i białka, analizę aktywności obu kompleksów białkowych mTORC1 i mTORC2, białek stymulujących oraz efektorowych, a także równoległych interferujących szlaków sygnałowych.

WNIOSEK KOŃCOWY

Cel pracy wynika z przedstawionych we Wstępie danych z piśmiennictwa, metodyka badań jest właściwa, a analiza materiału wnikliwa.

Biorąc pod uwagę wartość merytoryczną pracy, aspekt kliniczny i praktyczny, wkład pracy, przeprowadzenie wnikliwej dyskusji wyników oraz staranną szatę graficzną uważam że Rozprawa Doktorska spełnia warunki określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2016 poz. 882 z późn. zm.).

Na tej podstawie zwracam się do Pana Dziekana I Wydziału Lekarskiego Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie lek. Edyty Ulińskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

KIEROWNIK
Katedry i Kliniki Pediatrii, Hematologii
i Onkologii Dziecięcej
Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach

prof. dr hab. n. med. Tomasz Szczepański


Prof. dr hab. n. med. Tomasz Szczepański

Zabrze, 3 września 2018 r.