

Prof. dr hab. n. med. Jacek Trelński

Łódź, dnia 15.09.2018

**Recenzja rozprawy doktorskiej lek. med. Edyty Ulińskiej p.t.  
„Ocena aktywności i ekspresji kinazy mTOR w blastach oraz jej wpływu na  
przebieg kliniczny ostrej białaczki limfoblastycznej B-komórkowej u dzieci”**

Ostra białaczka limfoblastyczna jest najczęstszym nowotworem w populacji pediatrycznej i stanowi około 1/3 wszystkich chorób rozrostowych u dzieci. Nowoczesne metody chemioterapii, optymalna stratyfikacja chorych do grup ryzyka oraz postęp w leczeniu powikłań znacząco poprawiły rokowanie w tej grupie chorób. Dzięki temu wskaźniki przeżycia chorych sięgają obecnie 90%. Mimo tak dobrych rezultatów, nadal u 20-30% pacjentów dochodzi do nawrotu choroby. Leczenie celowane ukierunkowane na defekt molekularny leżący u podłoża choroby lub skierowane na szlak regulacyjny związany z nowotworzeniem jest zupełnie odmiennym podejściem do terapii nowotworu i stanowi obiecującą alternatywę dla pacjentów z chorobą oporną na chemioterapię. Najlepszym przykładem przełomu jaki dokonał się w onkohematologii było wprowadzenie do leczenia przewlekłej białaczki szpikowej inhibitorów kinaz tyrozynowych. Podobny pozytywny efekt na rokowanie, chociaż nie tak spektakularny, odnotowano po wprowadzeniu Imatynibu do leczenia ostrej białaczki limfoblastycznej *BCR/ABL(+)*. Aktualnie wiadomo, że w proces leukemogenezy zaangażowana jest dysregulacja wielu sieci sygnałowych takich jak: JAK/STAT, kinaz tyrozynowych ABL i SRC, NOTCH1 oraz mTOR. Ostatnio to właśnie szlak sygnałowy mTOR jest bardzo intensywnie badany jako potencjalny cel terapeutyczny w wielu nowotworach, w tym również układu krwiotwórczego. Inhibitory szlaku mTOR, są stosowane z coraz lepszymi efektami w takich chorobach jak rak nerki, oporny na leczenie chłoniak z komórek płaszczka, czy zaawansowany rak piersi.

W swojej pracy lek. med. Edyta Ulińska podjęła się m.in. analizy związków pomiędzy ekspresją białka mTOR oraz jego aktywnością w blastach B-komórkowej

ostrej białaczki limfoblastycznej, a przebiegiem klinicznym i rokowaniem choroby. Należy zatem podkreślić, iż wybór tematu pracy doktorskiej jest w pełni uzasadniony i dotyczy bardzo ważnego i aktualnego zagadnienia. Co więcej Doktorantka zadała sobie także trud oceny wpływu klasycznych czynników rokowniczych na skuteczność terapii w badanej grupie pacjentów.

Przedstawiona do oceny praca ma układ typowy dla rozpraw doktorskich. Liczy ogółem 166 stron maszynopisu i zawiera 101 pozycji piśmiennictwa, z których znakomita większość pochodzi z renomowanych czasopism zagranicznych, a aż 39 było opublikowanych w ostatnich 5 latach. Napisana jest poprawnym językiem i jest dobrze przygotowana pod względem edytorskim. Tekst uzupełniony jest 44 rycinami oraz zawiera 31 tabel. Zamieszczony na początku pracy wykaz skrótów ułatwia rozumienie tekstu. W liczącym 33 stron wstępie Doktorantka szczegółowo przedstawia zagadnienia związane z epidemiologią i patofizjologią ostrej białaczki limfoblastycznej B-komórkowej u dzieci oraz najważniejsze wyzwania związane z jej leczeniem. W dalszej części Autorka rozprawy w sposób jasny i wyczerpujący, w oparciu o dobrze dobrane piśmiennictwo omawia kinazę mTOR: budowę kompleksów białkowych mTORC1 i mTORC2, mechanizm przekazywania sygnału oraz czynniki wpływające na aktywność kompleksu. Wstęp jest zrozumiałym i logicznym wprowadzeniem do przedstawienia założeń pracy, świadczy o dużej wiedzy teoretycznej i praktycznej Doktorantki. Obowiązek recenzenta nakazuje mi zwrócić uwagę na nieuniknione w takich opracowaniach usterki redakcyjne. Są to głównie błędy literowe czy niezręcznie sformułowane zdania (np. „komórki wznowy charakteryzuje...” – powinno być „komórki białczkowe we wznowie”. Uważam, że część dotycząca kinazy mTOR jest niezwykle interesująca i może być sama w sobie materiałem do pracy pogładowej na ten temat.

Jako cele pracy Autorka stawia sobie: 1) Analizę ekspresji białka mTOR oraz jej aktywności w zakresie kompleksu mTORC1 w blastach B-komórkowej ALL u dzieci; 2) Ocenę, czy istnieje korelacja pomiędzy aktywnością kompleksu mTORC1, a przebiegiem klinicznym oraz rokowaniem w dziecięcej B-komórkowej ostrej białczce limfoblastycznej; 3) Porównanie aktywności i ekspresji kinazy mTOR w blastach pierwszego zachorowania na dziecięcą B-komórkową ALL oraz w komórkach nowotworowych przy wznowie choroby; 4) Określenie, czy analiza aktywności kinazy

mTOR w blastach B-komórkowej ostrej białaczki limfoblastycznej u dzieci może nieść za sobą implikacje kliniczne.

W liczącym osiem stron rozdziale „Materiał i metody” Doktorantka w sposób szczegółowy i przejrzysty przedstawiła charakterystykę badanych chorych jak i stosowane w pracy metody badawcze. Analizie poddano 86 preparatów rozmazowych szpiku kostnego, pochodzących łącznie od 68 pacjentów z rozpoznaniem B-komórkowej ALL. Przeprowadzono analizę danych klinicznych pacjentów oraz oceniono ekspresję i aktywność białka mTOR. Ekspresję wybranych białek szlaku mTOR oceniono techniką immunocytochemiczną w systemie detekcyjnym PowerVision, przy użyciu swoistych króliczych przeciwciał monoklonalnych (CellSignaling). Należy podkreślić, że Doktorantka stosowała nowoczesne i adekwatne do celów pracy metody. Pewne moje zastrzeżenia budzi metoda oceny intensywności ekspresji białek mTOR, dokonana co prawda przez 2 niezależnych cytologów, ale jednak była to ocena subiektywna. Zdecydowanie bardziej obiektywny byłby pomiar za pomocą cytometrii przepływowej lub metodą ELISA. Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej za pomocą właściwie dobranych testów.

Rozdział „Wyniki” liczy 62 strony i jest ilustrowany przez 21 tabel i 36 rycin. W przeprowadzonych badaniach Doktorantka wykazała, że wykrycie ekspresji białka mTOR u pacjentów z B-komórkową ostrą białaczką limfoblastyczną, wiąże się w sposób istotny statystycznie ze zwiększonym ryzykiem wznowy lub transformacji w AML. Dodatkowo analiza aktywności ścieżki mTORC1/p-S6p pokazała, że prawdopodobieństwo przeżycia wolnego od niekorzystnych zdarzeń istotnie malało wraz ze wzrostem aktywności badanego szlaku sygnałowego. Nie wykazano żadnych istotnych korelacji pomiędzy ocenianymi parametrami klinicznymi, takimi jak: płeć, wiek > 6 lat, WBC > 20tys/uł, odpowiedź na 8-dniową sterydoterapię, obraz szpiku w 15 i 33 dobie, grupa ryzyka, zaburzenia cytogenetyczne - a aktywnością szlaku mTORC1. W analizie wieloczynnikowej wykazano m.in. istotny ujemny wpływ zwiększonej aktywności ścieżki sygnałowej mTORC1/p-S6p na czas przeżycia wolnego od niekorzystnych zdarzeń (HR 4,675). Ponadto chorzy z grupy wysokiego ryzyka u których stwierdzono podwyższoną aktywność mTORC1/p-S6p charakteryzowali się istotnie krótszym czasem przeżycia wolnego od niekorzystnych zdarzeń (HR 2,943). Porównując ekspresję poszczególnych form białek szlaku

mTOR u chorych w czasie rozpoznania choroby oraz przy wznowie wykazano istotny wzrost ekspresji w okresie nawrotu. Podsumowując Doktorantka wykazała, że aktywność mTOR różni się u poszczególnych pacjentów, korelując istotnie z ryzykiem nawrotu ALL oraz jest wyższa przy wznowie, niż przy pierwszym rozpoznaniu choroby. Obowiązek recenzenta nakazuje mi zwrócić uwagę na niewielki błąd w Rycinie 26: na wykresach poszczególne grupy oznakowano od 0 do 3, a w podpisie od 1 do 4.

W interesującej dyskusji Doktorantka szczegółowo i wszechstronnie omawia uzyskane wyniki i porównuje je z wynikami badań innych autorów. Z należytą ostrożnością interpretuje wyniki własnej pracy i w logiczny sposób tłumaczy przyczyny istniejących rozbieżności w literaturze. Należy podkreślić, że Doktorantka z dużą łatwością porusza się w trudnych zagadnieniach dotyczących dysregulacji szlaku mTOR w chorobach limfoproliferacyjnych oraz związanych z tym implikacjom klinicznym. Lektura tego rozdziału po raz kolejny utwierdza czytelnika rozprawy w przekonaniu o głębokiej i usystematyzowanej wiedzy Doktorantki na temat zagadnień będących przedmiotem Jej badań, oraz o Jej zdolności krytycznego i twórczego korzystania z piśmiennictwa światowego. Wykazała Ona też umiejętność wnikliwej i rzetelnej oceny własnej pracy. Na szczególne uznanie zasługuje umiejętność dostrzegania ograniczeń własnego warsztatu badawczych, co pozwala Jej na uniknięcie formułowania nieuprawnionych lub zbyt daleko idących wniosków.

Na zakończenie lek. med. Edyta Ulińska przedstawiła 4 wnioski, które w pełni odpowiadają na założone wcześniej cele pracy. Za najważniejsze osiągnięcie wynikające z pracy uważam wykazanie przez Doktorantkę, że aktywność kompleksu mTORC1 może być rozpatrywana jako niezależny niekorzystny marker prognostyczny u dzieci z B-komórkową ALL.

Podsumowując stwierdzam, że przedłożona mi do oceny rozprawa doktorska stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, wykazuje teoretyczną wiedzę Doktorantki w zakresie odpowiedniej dyscypliny naukowej oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Tym samym spełnia ona wszystkie, określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuk (Dz.U.2016 poz.882 z późn.zm.), wymogi stawiane rozprawom doktorskim. Z uwagi na nowatorski charakter badań pracę tę uważam za wyróżniającą się.

**Mam więc zaszczyt i przyjemność wnioskować do Wysokiej Rady I Wydziału Lekarskiego Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie lek. med. Edyty Ulińskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

Prof. dr hab. n. med.  
JACEK BELIŃSKI  
HEMATOLOG  
Specjalista chorób wew.  
670 321