



Recenzja

pracy doktorskiej lek. med. **Magdaleny Romiszewskiej**

pt. **„Wpływ mutacji genów *JAK* na przebieg kliniczny i rokowanie ostrych białaczek limfoblastycznych u dzieci”**

przygotowana na prośbę Rady Dyscyplin Nauk Medycznych

Uniwersytetu Medycznego w Warszawie

Ostra białaczka limfoblastyczna (ALL, *acute lymphoblastic leukemia*) to niejednorodna grupa chorób o różnych cechach klinicznych, fenotypowych i genetycznych oraz zmiennej odpowiedzi na terapię. ALL z komórek B (B-ALL) i ALL z komórek T (T-ALL) to podstawowe immunofenotypy diagnozowane u dzieci, stanowiące odpowiednio 85% i 15% dziecięcej ALL. Dzięki dokładnej charakterystyce genetycznej i stratyfikacji ryzyka pacjentów, wskaźniki wyleczeń zarówno B-ALL, jak i T-ALL zdecydowanie wzrosły w ciągu ostatnich kilkudziesięciu lat. W ostatnich latach nastąpił ogromny rozwój w diagnostyce genetycznej z wykorzystaniem wysokoprzepustowych technik molekularnych, które znacznie poszerzyły wiedzę dotyczącą genetycznej heterogenności dziecięcej ostrej białaczki limfoblastycznej oraz złożonej biologii tego nowotworu, w kontekście współistnienia zaburzeń funkcji wielu genów. Wnioski płynące z analizy genomu limfoblastów ALL w ostatnich latach pozwoliły również na wyodrębnienie zaburzeń chromosomalnych, które są kluczowe w powstawaniu białaczki z poszczególnych linii limfoidalnych oraz mutacji wtórnych uczestniczących w progresji rozrostu klonalnego. Identyfikowanie submikroskopowych anomalii w genomie limfoblastów B-ALL o agresywnym przebiegu klinicznym doprowadziło w ostatnich latach do zmiany pojęcia białaczki wysokiego ryzyka. Obecnie główne znaczenie, niekorzystne rokowniczo, przypisuje się mutacjom, które pojawiają się we wszystkich podtypach białaczki, zarówno *BCR::ABL1*-pozytywnych, jak i w nowym podtypie B-ALL *BCR::ABL1*-like. Jest to podtyp B-ALL o profilu ekspresji genów podobnym do reprezentowanego przez białaczki *BCR::ABL1*-pozytywne, w których jednak nie wykrywa się translokacji *t(9;22)*, często obecne są natomiast zaburzenia funkcji genów uczestniczących w transdukcji sygnału z receptorów dla cytokin, tj. mutacje aktywujące kinazy z rodziny Janus (*JAK*) oraz rearanżacje genu *CRLF2* (cytokine-receptor-like factor 2). Obecnie ponad 90% dzieci ze zdiagnozowaną ALL jest ostatecznie wyleczonych z tej choroby. Niemniej jednak co 5. dziecko z ALL umiera lub doświadcza wznowy białaczki, której terapia jest niejednokrotnie wyzwaniem z powodu lekooporności oraz zmniejszonej tolerancji pacjenta na ponowne leczenie z zastosowaniem intensywnej chemioterapii. Wydaje się, że dalszy postęp w leczeniu dziecięcej ALL nie może się dokonać na drodze zwiększania dawek cytostatyków lub mnożenia połączeń lekowych w cyklach polichemioterapii, ale poprzez ulepszenie procesu stratyfikacji pacjentów do





grup ryzyka, z wykorzystaniem nowych markerów genetycznych, oraz poprzez wprowadzenie do schematów terapeutycznych leków ingerujących w procesy molekularne leukemogenezy.

W związku z powyższym, temat podjęty przez Doktorantkę dotyczący wpływu określonych mutacji genów ze szlaku JAK-STAT na przebieg kliniczny i rokowanie ostrych białaczek limfoblastycznych u dzieci jest aktualny i niezwykle istotny dla hematologów i onkologów dziecięcych.

Praca doktorska Pani lek. med. Magdaleny Romiszewskiej obejmuje 149 stron, na które składa się 9 typowych rozdziałów: streszczenie polskie, streszczenie angielskie, wstęp, założenia i cel pracy, materiały i metody badań, wyniki, dyskusja, wnioski, piśmiennictwo, opinia Komisji Bioetycznej oraz dodatkowe pomocne wykazy: spis tabel i rycin, wykaz użytych skrótów. Poszczególne części pracy są przygotowane w sposób typowy dla rozpraw doktorskich. Całość pracy wzbogaca 28 tabel oraz 36 rycin, które są przygotowane starannie, czytelnie i przejrzysto. Doktorantka przygotowała wykaz skrótów używanych w pracy co znacznie ułatwia czytanie i rozumienie tematyki.

We „Wstępie” Doktorantka w sposób bardzo dokładny opisała aktualny stan wiedzy dotyczący obowiązującej terminologii i epidemiologii ostrej białaczki limfoblastycznej, obrazu klinicznego pacjenta z ALL, podłoża molekularnego białaczek oraz klasyfikacji białaczek według WHO. Jako recenzent jestem zobowiązana zwrócić uwagę na to, że Doktorantka powołuje się na klasyfikację WHO z 2016 jednak na początku roku 2022 w czasopiśmie *Leukemia* została przedstawiona nowa 5 edycja klasyfikacji WHO znacznie rozszerzona i doprecyzowana, jeśli chodzi o B-komórkową ALL. Druga uwaga dotyczy rozbieżności w zapisach genów fuzyjnych (tj. zapis genów z myślnikiem lub z ukośnikiem). Co prawda według wytycznych opublikowanych w 2019 roku (Rack KA, et al. European recommendations and quality assurance for cytogenomic analysis of haematological neoplasms. *Leukemia*. 2019 Aug;33(8):1851-1867) zalecane jest stosowanie myślnika np. *BCR-ABL1*. Jednak w roku 2021 zostały już opublikowane nowe standardy o stosowaniu podwójnego dwukropka pomiędzy genami fuzyjnymi (Bruford, E.A. et al. HUGO Gene Nomenclature Committee (HGNC) recommendations for the designation of gene fusions. 2021, *Leukemia* 35, 3040–3043). W związku z tym, zaleca się stosowanie jednego zapisu w całości pracy. Nie mniej jednak Doktorantka bardzo dokładnie omawia poszczególne podtypy genetyczne wykazując się dużą wiedzą i biegłością w tej tematyce. Kolejno opisuje podłoże genetyczne w T-komórkowej ALL, w której jak dotąd nie zidentyfikowano markera genetycznego, który mógłby odgrywać znaczącą rolę w stratyfikacji pacjenta tak jak oznaczanie MRD. Doktorantka bardzo dokładnie omawia budowę, funkcje kinaz janusowych oraz mutacje genetyczne jakie mogą występować w obrębie genów kodujących kinazy janusowe. Dobrze przygotowana dokumentacja w postaci tabel i rycin dopełnia tę część rozprawy doktorskiej. W sposób przystępny opisuje obowiązujące leczenie ALL w Polsce, leczenie celowane, a także możliwość wykorzystania immunoterapii u pacjentów z BCP-ALL. We wstępie doktorantka wykazała się znajomością klinicyzyczną, ale także znajomością standardów diagnostycznych, które stanowią wieloetapowy proces rozpoznania ALL. Doktorantka wykazała się także wystarczającą wiedzą dotyczącą badań molekularnych wykorzystywanych obecnie w hematoonkologii.





Doktorantka określiła w swojej pracy badawczej 6 celów, które zostały sformułowane w sposób jasny, zrozumiały i wyznaczają logiczny kierunek prowadzonych badań.

W rozdziale „Materiał i Metody Badań” Doktorantka zaznacza, że badania zostały wykonane w ramach realizacji projektu badawczego „Wieloczynnikowe molekularne profilowanie ostrej białaczki limfoblastycznej BCR-ABL1-like”, w latach 2011 – 2016, gdzie zgromadzono w bazie danych dane 1213 dzieci z ALL leczonych w 14 ośrodkach hematologii dziecięcej w Polsce leczonych według protokołu ALL IC-BFM 2002, ALL IC-BFM 2009, EsPhALL oraz INTERFANT-06. Doktorantka dokonała pewnej selekcji zgromadzonego materiału ze względu na liczne braki kluczowych danych klinicznych i laboratoryjnych czy ograniczonej ilości materiału pobranego w trakcie biopsji szpiku kostnego, i dlatego ostateczną grupę badaną stanowiło jedynie u 432 dzieci i dla nich udało się przeprowadzić badanie cytometryczne w celu oceny ekspresji białka CRLF2. Doktorantka przedstawia charakterystykę badanej populacji pacjentów opisując rozpoznanie, schematy leczenia, kwalifikację pacjentów do grup ryzyka w zależności od zastosowanego protokołu. Kolejno przechodzi do opisu metodyki badań. Jako recenzent muszę zwrócić uwagę, że ten fragment pracy jest dość krótki i skromny. Całość badań uzyskała pozytywną opinię uczelnianej Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym w Łodzi oraz w Warszawie.

Rozdział „Wyniki” został przedstawiony bardzo obszernie na 59 stronach i podzielony na podrozdziały, z dokumentacją obejmującą liczne tabele oraz ryciny doskonale obrazujące uzyskane wyniki prowadzonych badań. Każdy podrozdział opisuje zależność cechy klinicznej pacjentów (płeć, wiek w momencie rozpoznania, obecność zespołu Downa, wstępna leukocytoza, liczba blastów we krwi obwodowej, zajęcie ośrodkowego układu nerwowego, zajęcie jąder u chłopców czy obecność znanych rokowniczo zmian genetycznych) oraz odpowiedzi na zastosowane leczenie (odpowiedź na sterydy w 8. dobie leczenia, ocenę cytomorfologiczną szpiku kostnego oraz poziom MRD w 15. i 33. dobie leczenia indukcyjnego), do badanej zmiennej genetycznej jakimi są mutacje szlaku JAK-STAT. Zaletą tego rozdziału jest przedstawienie wyników w sposób czytelny i przejrzysty z zawartym zdaniem podsumowującym każdy element badawczy pracy. Z obowiązku recenzenta chciałam zauważyć, że w tabeli 14 str. 91 Doktorantka posługuje się przestarzałą nomenklaturą genową stara nazwa *MLL* teraz *KMT2A* oraz *TEL::AML1* teraz obowiązuje *ETV6::RUNX1*, ale przyjmuje założenie, że doktorantka posługiwała się danymi ze starych protokołów, w których obowiązała ówczesna nomenklatura genowa. Jednak chciałabym podkreślić tę część pracy jako wyróżniającą się. Doktorantka w sposób zrozumiały, bardzo szczegółowy i należycie staranny przedstawiła uzyskane wyniki. Co więcej, Doktorantka jest świadoma niektórych ograniczeń w prowadzonych analizach z powodu liczebności grupy i wyraźnie to zaznacza cyt. „Uzyskane wyniki należy interpretować z dość dużą dozą ostrożności ze względu na niewielkie liczebności próby”, co świadczy o dojrzałości naukowej Doktorantki. Metodyka badań oraz sposoby analizy danych zostały dobrane właściwie do realizacji zamierzonych celów badań. Do analizy uzyskanych wyników zastosowano adekwatne metody statystyki.

W rozdziale „Dyskusja”, który został zawarty na 12 stronach, Doktorantka omawia wyniki własnych badań w odniesieniu do danych z piśmiennictwa polskiego i światowego. Rozdział ten stanowi wyraz dużej





wiedzy teoretycznej i kompetencji Doktorantki, zrozumienia przeprowadzonych badań i ich krytycznej analizy w stosunku do prac innych grup badawczych. Autorka odnosi się do znaczenia otrzymanych wyników dla praktyki klinicznej i wykazuje w swoich analizach, że co prawda nie wykazano, aby mutacje *JAK2* miały istotny wpływ na skuteczność leczenia czy rokowanie BCP-ALL u dzieci, ale niezbędna jest ocena skuteczności zastosowania inhibitorów szlaku JAK-STAT u tych dzieci i ich wpływu na możliwość zmniejszenia toksyczności standardowej chemioterapii, jak również zmniejszenia ryzyka występowania zdarzeń niekorzystnych. Doktorantka właściwie weryfikuje hipotezy badawcze oraz podsumowuje swoją rozprawę 9 wnioskami, ogólnie poprawnie sformułowanymi i wynikającymi z przeprowadzonych badań. Stanowią one wyczerpującą odpowiedź na postawione zadania badawcze. Jednak wniosek nr 7 zmodyfikowałabym na następujący: U dzieci z zespołem Downa częściej stwierdza się nadekspresję *CRLF2* niż u dzieci bez Zespołu Downa. Przedstawione wnioski mają wartość poznawczą oraz kliniczną.

Rozdział „Piśmiennictwo” obejmuje 152 pozycji w większości anglojęzycznych, które stanowią przegląd literatury dotyczącej omawianej tematyki i zostały przez Doktorantkę dobrane zgodnie z poruszaną problematyką.

Rozprawę doktorską uzupełniają zwarte i przejrzyste streszczenia w języku polskim oraz angielskim.

Praca napisana jest poprawną polszczyzną. Drobne błędy stylistyczne i edytorskie nie wpływają na obniżenie wartości pracy. Doktorantka wykazała się umiejętnością poprawnego formułowania i rozwiązania aktualnego problemu badawczego, uzyskała interesujące i praktycznie ważne wyniki oraz wykazała się dobrą znajomością problematyki prowadzonych badań. Doktorantka osiągnęła zamierzone cele, dając dowód umiejętności samodzielnego prowadzenia pracy naukowej.

Przeprowadzone przez Doktorantkę badania i uzyskane wnioski, mają znaczenie praktyczne i są niezwykle interesujące oraz ważne z punktu widzenia zarówno diagnosty jak i klinicysty. Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska stanowi podsumowanie badań genetycznych dotyczących sygnatury genowej *JAK* szlaku JAK-STAT wraz z parametrami kliniczno-laboratoryjnymi u pacjentów z rozpoznaniem ALL. Praca pokazuje także korelację uzyskanych wyników genetycznych z efektem terapeutycznym. Efekty tych badań mogą być zachętą do prowadzenia dalszych badań jak zresztą sugeruje Doktorantka na szerszej grupie pacjentów oraz do napisania publikacji w wysokopunktowanym czasopiśmie naukowym.

Podsumowując, 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. nr 65, poz. 595 z późn. zm.) w związku z art. 179 ust. 1 ustawy z dnia 3 lipca 2018r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018r. poz. 1669 z późn. zm.)”. Przedstawioną rozprawę doktorską oceniam bardzo pozytywnie.





Wnoszę do Rady Dyscyplin Nauk Medycznych Uniwersytetu Medycznego w Warszawie o dopuszczenie Pani lek. med. Magdaleny Romiszewskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Samodzielna Pracownia Diagnostyki Genetycznej
II Katedry Pediatrii
Uniwersytetu Medycznego w Lublinie
20-093 Lublin, ul. prof. Antoniego Gębali 6
fax: 81-71-747-72-20
tel.: 81-71-85-211, 81-71-85-197

Kierownik
Samodzielnej Pracowni Diagnostyki Genetycznej
II Katedry Pediatrii Uniwersytetu Medycznego
w Lublinie
Monika Lejman
Dr hab. n. med. Monika Lejman

dr hab. n. med. Monika Lejman, prof. UML

Samodzielna Pracownia Diagnostyki Genetycznej

II Katedry Pediatrii Uniwersytetu Medycznego w Lublinie

