

Prof. dr hab. med. Wojciech Młynarski  
Klinika Pediatrii, Onkologii i Hematologii  
I Katedra Pediatrii UM w Łodzi  
ul. Sporna 36/50, 91-738 Łódź

## Ocena

Rozprawy doktorskiej Pani mgr Bronisławy Szarzyńskiej-Zawadzkiej  
p.t.  
**„Czynniki genetyczne w dziecięcej ostrej białaczce limfoblastycznej  
z prekursorów limfocytów T (T-ALL):  
ocena wartości prognostycznej i znaczenia w biologii choroby”**

Ostra białaczka limfoblastyczna jest najczęstszym nowotworem złośliwym wieku dziecięcego. Aktualnie stosowane programy terapeutyczne, oparte na stratyfikacji ryzyka wznowy, pozwalają na osiągnięcie remisji u 98% oraz na uzyskanie 5-letniego przeżycia wolnego od niekorzystnych zdarzeń (EFS – *event free survival*) u 85-90% pacjentów. Główną przyczyną niepowodzenia terapeutycznego i zgonu w przebiegu białaczki jest nawrót choroby, co może być pochodną podtypu molekularnego nowotworu. Niekorzystnym czynnikiem prognostycznym jest immunofenotyp białaczki wywodzącej się z limfoblastów linii T (T-ALL). Ten podtyp ostrej białaczki limfoblastycznej występuje istotnie rzadziej w populacji pediatrycznej, przez co badanie molekularnego podłoża choroby jest trudniejsze, ale poznanie uwarunkowania genetycznego T-ALL może mieć istotne znaczenie kliniczne.

I właśnie identyfikacji roli klinicznej wybranych defektów genetycznych obserwowanych w komórkach ostrej białaczki limfoblastyczna z linii T u dzieci poświęcona jest niniejsza rozprawa doktorska.

Rada Naukowa Instytutu Genetyki PAN w Poznaniu powierzyła mi rolę recenzenta rozprawy doktorskiej Pani mgr Bronisławy Szarzyńskiej-Zawadzkiej.

Rozprawę Pani mgr Szarzyńskiej-Zawadzkiej otrzymałem w postaci cyklu trzech publikacji dotyczących zaburzeń genetycznych obserwowanych w komórkach somatycznych ostrej białaczki limfoblastycznej z linii T poprzedzonych wprowadzeniem i celami pracy oraz uzupełnionych wnioskami, streszczeniem w języku polskim i angielskim. Dodatkowo, przedstawiono podpisane przez wszystkich

współautorów formularze zgody na wykorzystanie publikacji w rozprawie doktorskiej Kandydatki.

We wstępie Autorka charakteryzuje dane literaturowe na temat mechanizmów patogenetycznych prowadzących do wystąpienia ostrej białaczki limfoblastycznej z linii T. Na podkreślenie zasługuje sposób prezentacji dotychczasowej wiedzy wiążącej obserwowane w komórkach białaczkowych defekty genetyczne z *zaburzeniami sygnałów* wewnątrzkomórkowych. i zaburzeniami. Przytaczane dane literaturowe pochodzące w badań podstawowych i klinicznych pozwalają na relatywnie łatwe zrozumienie przez czytelnika udziału zmian genetycznych w procesie zaburzenia różnicowania limfocytów T i następczej leukemogenezy. Taki sposób prezentacji świadczy o zrozumieniu złożonych zagadnień współczesnej onkologii i biologii molekularnej oraz o dojrzałości Doktorantki jako pracownika naukowego i popularyzatora nauki.

Autorka założyła sobie bardzo ambitny cel pracy, którym była chęć identyfikacji nowych czynników genetycznych o znaczeniu prognostycznym w ostrej białaczce limfoblastycznej z prekursorów limfocytów T. W szczególności Pani mgr Szarzyńska-Zawadzka chciała powiązać wybrane defekty genetyczne takie jak: obecność translokacji t(8;14)(q24;q11) oraz mutacje i zmiany liczby kopii genów *NOTCH1*, *FBXW7*, *PTEN*, *WT1*, *IL7R*, *STAT5B*, *FLT3*, *RUNX1*, *DNMT3A*, *SIL-TAL1*, *LEF1*, *CASP8AP2*, *MYB*, *EZH2*, *CDKN2A/B*, *MLLT3*, *NUP214-ABL1*, *LMO1*, *LMO2*, *NF1*, *SUZ12*, *PTPN2* i *PHF6* z przebiegiem klinicznym choroby.

Dokumentację realizacji założonych celów rozprawy doktorskiej stanowi cykl prac, na który składały się następujące publikacje:

1. Skalska-Sadowska J, Dawidowska M, Szarzyńska-Zawadzka B, Jarmuż-Szymczak M, Czerwińska-Rybak J, Machowska L, Derwich K. Translocation t(8;14)(q24;q11) with concurrent PTEN alterations and deletions of STIL/TAL1 and CDKN2A/B in a pediatric case of acute T-lymphoblastic leukemia: A genetic profile associated with adverse prognosis. *Pediatr Blood Cancer*. 2017 Apr;64(4).
2. Szarzyńska-Zawadzka B, Kosmalka M, Sędek Ł, Sonsala A, Twardoch M, Kowalczyk JR, Szczepański T, Witt M, Dawidowska M. Cost-effective screening of DNMT3A coding sequence identifies somatic mutation in pediatric T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Eur J Haematol*. 2017 Dec;99(6):514-519.
3. Szarzyńska-Zawadzka B, Kunz J, Sędek Ł, Kosmalka M, Zdon K, Biecek P, Bandapalli OR, Kraszewska-Hamilton M, Jaksik R, Drobna M, Kowalczyk

JR, Szczepański T, Van Vlierberghe P, Kulozik AE, Witt M, Dawidowska M. PTEN abnormalities predict poor outcome in children with T-cell acute lymphoblastic leukemia treated according to ALL IC-BFM protocols. Am J Hematol. 2019 Jan 7.

W cyklu prac, pierwsza praca to studium przypadku klinicznego, a dwie kolejne to publikacje o charakterze oryginalnych doniesień naukowych publikowanych w czasopismach anglojęzycznych ze współczynnikiem oddziaływania odpowiednio 2,646; 2,595 i 5,303. W opisie przypadku klinicznego Pani Magister jest trzecim autorem, a w obu artykułach oryginalnych pierwszym autorem.

W pierwszej pracy, będącej opisem pacjenta z ostrą białaczką limfoblastyczną z linii T i subklonalną rearanżacją t(8;14)(q24;q11) z udziałem onkogeny *MYC*, Autorka rzetelnie dokumentuje zjawisko selekcji klonalnej. Ciekawą i oryginalną obserwacją jest identyfikacja mutacji genu *PTEN*. Przy rozpoznaniu choroby wykazano obecność monoallelicznej delecji części genu, a w komórkach ze wznowy choroby dodatkowo zidentyfikowano mutację typu nonsens, co sugeruje bialleliczną inaktywację genu *PTEN*. W opinii recenzenta, być może szkoda, że Autorka nie pokusiła się o wykorzystanie głębokiego sekwencjonowania techniką NGS próbki DNA w pierwszym rozpoznaniu choroby, co mogłoby pozwolić na odpowiedź czy mutacja terminująca w eksonie 7 genu *PTEN* była obecna pierwotnie czy pojawiła się wtórnie przy nawrocie choroby. Odpowiedź na to pytanie mogłaby mieć nie tylko poznawcze, ale również użyteczne, kliniczne znaczenie.

Częściową odpowiedzią na powyższe pytanie można znaleźć w trzeciej publikacji Pani mgr Szarzyńskiej-Zawadzkiej, w której Kandydatka skupiła się na identyfikacji mutacji i delecji genu *PTEN* w komórkach ostrej białaczki limfoblastycznej z linii T pochodzącej z dużej kohorty pacjentów pediatrycznych leczonych dwoma protokołami leczenia ALL-IC BFM 2002 i ALL-IC BFM 2009. Autorka udokumentowała, że obecność defektywnego genu *PTEN* w T-ALL wiąże się niekorzystnym rokowaniem, zarówno analizując prawdopodobieństwa przeżycia całkowitego i przeżycia wolnego do nawrotu choroby, przy czym efekt ten podlega interakcji z wartością choroby resztkowej mierzonej metodą cytometryczną w 15

dobie leczenie indukującego remisję. Obserwację tą można potraktować jako pionierska w świetle danych literaturowych.

Z kolei w publikacji nr 2 Doktorantka podjęła się ryzykownego podejścia badawczego poszukując mutacji w genie jednej z metylotransferaz DNA, *DNMT3A*. Hipotezę do swoich badań oparła na danych literaturowych pochodzących z badań ostrej białaczki szpikowej oraz T-ALL u osób dorosłych. Autorka wykazała relatywnie niższą częstość mutacji genu *DNMT3A* w grupie pacjentów pediatrycznych z T-ALL (<2%), co sugeruje tło patogenetyczne tego typu białaczki u dzieci w porównaniu z osobami dorosłymi. Uzyskane wyniki mają charakter walidacyjny i wpisują się w aktualnie prowadzone badania publikowane przez inne liczące się na świecie grupy badawcze.

Ogólnie, tak pod względem merytorycznej zawartości, poprawności zaplanowania badań, ich przeprowadzenia, jak również pod względem ogólnej formy i organizacji treści cykl prac oceniam bardzo wysoko.

Chociaż w całości rozprawa nie budzi wątpliwości w zakresie oryginalności tematyki badawczej, zastosowanej metodyki badań, czy interpretacji wyników tych badań, pragnę - z obowiązku recenzenta - zwrócić uwagę Doktorantki na pewne drobne uchybienia, które wzbudziły moje wątpliwości:

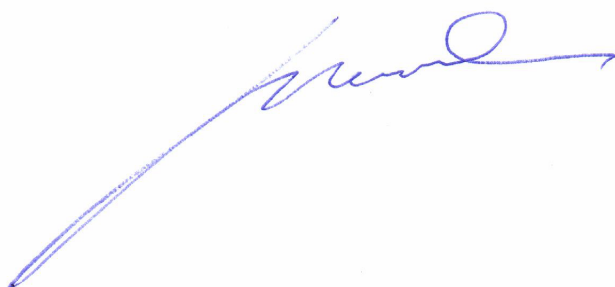
- Zależność nazywana „*korelacją*” to w naukach biologicznych bardzo precyzyjne pojęcie mówiące o porównaniu minimum dwóch zmiennych ciągłych, dlatego warto, zamienić słowo „*korelacja*” na „*zależność*” czy „*związek*” - patrz rozdział: *Cele pracy*
- Poziom, a raczej liczba blastów w szpiku kostnym to nic innego jak wartości choroby resztkowej mierzonej odpowiednio w 15 i 33 dobie terapii – w rozdziale *Cele pracy* oba parametry zostały potraktowane oddzielnie

Przytoczona powyżej uwaga, natury bardziej redakcyjnej, nie umniejsza w żadnym stopniu wartości merytorycznej rozprawy i mojej bardzo pozytywnej opinii o tej wyróżniającej się pracy Pani mgr Bronisławy Szarzyńskiej-Zawadzkiej.

W podsumowaniu stwierdzam, że ta bardzo wartościowa rozprawa jest świadectwem, iż Doktorantka wykazała umiejętność samodzielnego rozwiązywania problemów naukowych i badawczych, wykazując potrzebną do tego wiedzę, jak i przygotowanie teoretyczne w zakresie zagadnień, których rozprawa dotyczy. Praca ta zawiera bez wątpienia wybitne elementy nowości naukowej, a przedstawione wyniki wskazują, że cele badawcze stawiane przez Doktorantkę zostały zrealizowane nawet z nadwyżką. Praca stanowi dowód, iż Autorka w kompetentny sposób zgromadziła wyniki swoich obserwacji oraz w dojrzały sposób je zweryfikowała. Wymiernym rezultatem badań były publikacje, z pewnością poddane wnikliwej ocenie przez recenzentów, w takich znaczących czasopismach z kręgu onkohematologii jak *Pediatric Blood and Cancer*, *European Journal of Haematology* oraz *American Journal of Hematology*.

Uwzględniając warsztat badawczy, wartości poznawcze i znaczenie praktyczne dociekań naukowych z prawdziwą przyjemnością przedkładam Wysokiej Radzie Instytutu Genetyki PAN w Poznaniu wnioski o dopuszczenie Pani mgr Bronisławy Szarzyńskiej-Zawadzkiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego oraz publicznej obrony pracy doktorskiej.

Jednocześnie, ze względu na nowatorskie obserwacje i koncepcje badawcze, leżące u źródeł ocenianej pracy, które pozwoliły na publikację wyników w renomowanych czasopismach z listy filadelfijskiej wnioskuję o wyróżnienie pracy.



Łódź, dnia 3 czerwca 2019 roku