

Prof. dr hab. n. med. Jacek Roliński
KATEDRA I ZAKŁAD IMMUNOLOGII KLINICZNEJ
UNIwersytet Medyczny w Lublinie

ul. Chodźki 4a
20-093 Lublin

Tel. (0-81) 448 64 20
fax (0-81) 448 64 21
e-mail: jacek.rolinski@gmail.com

Lublin dn. 29.06.2021r.

Ocena

rozprawy doktorskiej magister Katarzyny Blachnio zatytułowanej: „Cytometryczno - cytogenetyczne czynniki prognostyczne w przewlekłej białaczce limfocytowej oraz zmiany subpopulacji limfocytów krwi w trakcie leczenia o potencjalnym znaczeniu prognostycznym” wykonanej w Zakładzie Patologii i Diagnostyki Laboratoryjnej - Pracownia Cytometrii Przepływowej, Narodowego Instytutu Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie - Państwowy Instytut Badawczy w Warszawie

Promotorem pracy jest dr hab. n. med. Grzegorz Rymkiewicz

Tematem przedstawionej do recenzji rozprawy doktorskiej jest ocena wybranych czynników prognostycznych zarówno tych znanych cytometryczno-cytogenetycznych jak i nowych potencjalnych dotyczących zmian subpopulacji limfocytów krwi w trakcie leczenia przewlekłej białaczki limfocytowej. Rozrosty wywodzące się z linii limfocytów B, do których należy przewlekła białaczka limfocytowa (PBL) stanowią heterogenną grupę nowotworów o odmiennym rokowaniu w zależności od wielu czynników, których ocena ma istotny wpływ na decyzje terapeutyczne i sposób postępowania z pacjentem. PBL charakteryzuje się akumulacją morfologicznie dojrzałych, lecz niesprawnych czynnościowo, monoklonalnych limfocytów B w tkance limfoidalnej, krwi obwodowej, szpiku kostnym, śledzionie, a także w innych narządach. PBL stanowi od 25% do 30% wszystkich rozpoznań białaczek, co czyni ją najczęstszym typem tego nowotworu wśród dorosłych mieszkańców Europy i Ameryki Północnej. Komórki białaczkowe PBL wykazują charakterystyczny immunofenotyp:

koekspresja markerów pan-B (CD19+, CD20+), CD23+ oraz CD5 (przy braku innych antygenów pan-T, takich jak: CD2, CD3 i CD7), słaba ekspresja immunoglobulin powierzchniowych, CD20, CD79b w porównaniu do prawidłowych limfocytów B. Dodatkowo obecna jest monoklonalna ekspresja jednego lekkiego łańcucha: kappa lub lambda. Mimo z definicji przewlekłego charakteru choroby, PBL cechuje znaczna heterogenność. U ok. 70% pacjentów, pomimo łagodnego początku choroby, w ciągu 5-10 lat rozwija się faza terminalna, a w przypadku agresywnej postaci pacjenci żyją tylko 2-3 lata od ustalenia diagnozy. Od lat siedemdziesiątych XX wieku trwają intensywne prace nad wyróżnieniem czynników prognostycznych pomocnych w ocenie rokowania i warunkujących dobór odpowiedniej formy terapii. Dlatego też podjęcie przez Doktorantkę tematu badań związanego z oceną czynników prognostycznych wydaje się interesujące nie tylko z onkologicznego punktu widzenia, ale również z powodu możliwości praktycznego wykorzystania tych wyników.

Praca doktorska mgr Katarzyny Błachnio liczy 145 stron tekstu, zawiera 34 ryciny, 13 tabel i ma układ treści typowy dla prac eksperymentalnych. Rozprawa obejmuje, klasyczne dla tego typu prac części: spis treści, wykaz tabel i rycin, wykaz stosowanych skrótów, streszczenie w języku polskim i angielskim, wstęp, cel pracy, materiał i metody, metody, analizy statystyczne, wyniki, dyskusja, podsumowanie wyników i wnioski końcowe oraz piśmiennictwo liczące 213 pozycji. Znajdujący się na końcu pracy załącznik nr 1 zawiera charakterystykę ocenianych 260 chorych z PBL + 10 zdrowych. Załącznik nr 1 podzielono na dwie Tabele 5 i 6 w których przedstawiono wyniki badań cytogenetycznych, FISH, MFI CD20 i BCL2. Praca napisana jest poprawnie językowo, czytelną polszczyzną i zawiera jedynie nieliczne potknięcia stylistyczne i gramatyczne, które w żadnej mierze nie umniejszają jej walorów merytorycznych.

W liczącym 20 stron wstępie Doktorantka dokonała przeglądu piśmiennictwa dotyczącego poruszanej problematyki. Na początku opisała białaczkę (PBL), która była głównym tematem przeprowadzonych badań. Przedstawiła kryteria rozpoznania i charakterystykę kliniczną

choroby, aktualne czynniki prognostyczne, stosowane metody leczenia oraz zaburzenia jakościowe i ilościowe komórek układu odpornościowego u chorych na PBL. W ocenie recenzenta wstęp jest kompendium wiedzy na temat PBL, co świadczy o dobrym przygotowaniu teoretycznym Doktorantki do dalszych badań. Został on napisany jasnym i zrozumiałym językiem.

Cel pracy został przedstawiony w 3 punktach ze szczegółowym rozwinięciem punktu 3 na trzy podpunkty 3A, 3B, 3C dotyczące części eksperymentalnej związanej z oceną wpływu leków na białaczkowe i prawidłowe komórki układu odpornościowego.

W części Materiał i Metody Doktorantka scharakteryzowała grupę badaną chorych na PBL z podaniem danych na temat zastosowanych przeciwciał monoklonalnych, metod leczenia, odpowiedzi na leczenie oraz leków zastosowanych do badań „in vitro”. Rozwinięciem tego rozdziału jest część zatytułowana Metody, w której opisano sposób pozyskiwania materiału do badań: 1) krew obwodową 2) komórki z biopsji węzła chłonnego. Zwłaszcza ta ostatnia technika (biopsja w. chłonnego lub narządów) wprowadzona i stosowana od wielu lat przez promotora pracy dr hab. n. med. Grzegorza Rymkiewicza w Pracowni Cytometrii Przepływowej, jest warta podkreślenia i szerszego stosowania w Polsce. Dzięki wiedzy patomorfologiczno-onkologicznej, znajomości tej techniki i zastosowaniu cytometru przepływowego można w krótkim czasie postawić wstępną diagnozę nowotworu, bez często długiego oczekiwania na wynik badania histopat. Promotorowi i Doktorantce należą słowa uznania za umiejętne wykorzystanie i posługiwanie się tą techniką w codziennej diagnostyce onkologicznej. W tej części rozprawy dokładnie opisano również techniki cytometryczne, sposób bramkowania i analizy komórek, ocenę MFI, badania in vitro z zastosowaniem wybranych leków, a w końcowej części badania kariotypu i aberracji cytogenetycznych. Analizę statystyczną magister Katarzyna Błachnio przeprowadziła przy pomocy programu SAS i testów statystycznych wykorzystywanych w tego rodzaju pracach.

Rozdział dotyczący wyników badań podzielono na II części. W części I (wyniki dotyczące diagnostyki cytometryczno-cytogenetycznej) przedstawiono szczegółowo i udokumentowano 14 rycinami (w tym 2 zdjęcia obrazujące wyniki analizy FISH) wyniki badań cytometrycznych i cytogenetycznych. Doktorantka dokonała oceny składu odsetkowego poszczególnych subpopulacji badanych komórek. Wyniki te skorelowała z wynikami badań cytogenetycznych i znanymi czynnikami prognostycznymi takimi jak CD38 i CD49d. Wykonane badania wykazały istotne różnice w odsetku komórek CD49d (-) u chorych z delecją i bez tej delecji 11q oraz 13q14. U pacjentów z PBL, których komórki wykazywały ekspresję CD49d nie wykazano obecności delecji 17p. Interesujące są wyniki przedstawiające porównanie odsetka i ekspresji CD38 i CD49d na komórkach pozyskanych z krwi obwodowej i węzła chłonnego. Średnie odsetki komórek CD38+ i CD49d+ były istotnie wyższe w materiale uzyskanym z węzła chłonnego, niż z krwi obwodowej. W przypadku CD38 odpowiednio 53,43% vs 38,87%, w przypadku CD49d odpowiednio 95,6% vs 40,32%. W przypadku aberracji cytogenetycznych oznaczonych metodą FISH stwierdzono istotnie częstsze występowanie delecji 13q14 w komórkach krwi obwodowej niż w komórkach węzła chłonnego. Ocena mediany intensywności fluorescencji MFI CD20 i MFI BCL2 we krwi i węzłach chłonnych nie wykazała istotnych różnic pomiędzy komórkami krwi obwodowej i węzła chłonnego. Taką zależność Doktorantka stwierdziła w przypadku badań cytogenetycznych. U chorych z delecją 13q14 i delecją 11q wykazała istotnie niższą wartość MFI CD20, niż u pacjentów bez delecji 13q14. Dodatkowo badania wykazały istotny związek między obecnością delecji 13q14 a poziomem ratio MFI BCL2. Z innych interesujących wyników na które należy zwrócić uwagę to korelacja odpowiedzi na leczenie rytuksymabem z wysokością MFI CD20.

W II eksperymentalnej części badań uzyskano również interesujące wyniki. Mgr Katarzyna Błachnio wykazała, że wraz ze wzrostem współczynnika korelacji liczby komórek PBL i komórek NK CD56 bright występuje większe prawdopodobieństwo uzyskania tylko częściowej

remisji (PR) lub nawrotu choroby. Chorzy ze splenomegalią mieli istotnie niższą liczbę komórek NK CD56 bright we krwi obwodowej. Natomiast zarówno leukocytoza (WBC) jak i bezwzględna liczba limfocytów istotnie ujemnie korelowały ze wskaźnikiem tempa spadku liczby limfocytów białaczkowych PBL oraz ze wskaźnikami tempa spadku limfocytów T.

Przedstawione w pracy doktorskiej wyniki badań są ważną informacją na temat nowoczesnego i praktycznego podejścia do diagnostyki i leczenia PBL. Omówienie wyników jest szczegółowe, należy podkreślić umiejętne i krytyczne przedstawienie otrzymanych wyników w porównaniu do innych publikacji z tego zakresu. Założone cele badań zostały w pełni zrealizowane, a wnioski mające źródło w przeprowadzonych doświadczeniach stanowią wyczerpujące podsumowanie zagadnień zawartych w celach pracy. Co prawda „Podsumowanie Wyników i Wnioski Końcowe” znajdujące się po rozdziale Dyskusja jest wg recenzenta zbyt obszerne i zawiera zbyt wiele punktów (łącznie 37 pkt). Nie wiadomo które z nich można zaliczyć do wniosków wypływających z przeprowadzonych badań, a które są podsumowaniem uzyskanych wyników i dotychczasowych znanych już z piśmiennictwa danych na temat PBL. Sądzę, że przygotowując rozprawę do publikacji do czego gorąco zachęcam Doktorantkę, warto znacznie skrócić „Podsumowanie Wyników i Wnioski Końcowe” ograniczając się tylko do wniosków będących podsumowaniem najważniejszych wyników badań. Podjęty temat stwarza solidną podstawę do kolejnych badań na tym polu. Cała rozprawa przygotowana jest czytelnie i przejrzysto. Przedstawiony problem badawczy oraz uzyskane wyniki zaprezentowane są w logiczny sposób.

Podsumowując stwierdzam, że praca doktorska magister Katarzyny Błachnio zatytułowana „Cytometryczno-cytogenetyczne czynniki prognostyczne w przewlekłej białaczce limfocytowej oraz zmiany subpopulacji limfocytów krwi w trakcie leczenia o potencjalnym znaczeniu prognostycznym” jest opracowaniem oryginalnym które wnosi nowe fakty do wiedzy na temat diagnostyki i leczenia przewlekłej białaczki limfocytowej. Temat

rozprawy jest nowatorski, a praca jest dobrze merytorycznie opracowana. Rozprawę oceniam wysoko i uważam, że zasługuje ona na wyróżnienie. Przedstawiona mi do oceny praca doktorska spełnia warunki określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. nr 65, poz. 595 z późn. Zm.). Tak więc spełnia wszystkie wymogi stawiane pracom na stopień doktora nauk medycznych. Mam przyjemność przedstawić Wysokiej Radzie Naukowej Instytutu Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie PIB w Warszawie wniosek o dopuszczenie mgr Katarzyny Błachnio do dalszych etapów przewodu doktorskiego oraz wyróżnienie pracy cum laude.

