

<b>Uniwersytet Rzeszowski</b> Al. Rejtana 16 C, 35-959 Rzeszów		<b>Klinika Onkohematologii Dziecięcej</b> <b>Katedra Pediatrii</b> <b>Instytut Nauk Medycznych</b> <b>Uniwersytet Rzeszowski</b>
---	---	---

Dr hab. n. med. Radosław Chaber, prof. UR  
Katedra Pediatrii. Klinika Onkohematologii Dziecięcej  
Instytut Nauk Medycznych  
Uniwersytet Rzeszowski

Rzeszów, 15.09.2020

### **Recenzja rozprawy doktorskiej magistra Adriana Krygiera pt.:**

#### **„Ocena ekspresji i polimorfizmów genów, kodowanych przez nie czynników transkrypcyjnych oraz transkryptu genu fuzyjnego RUNX1-RUNX1T1 w ostrej białaczce szpikowej”**

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pana magistra Adriana Krygiera pt.: „Ocena ekspresji i polimorfizmów genów, kodowanych przez nie czynników transkrypcyjnych oraz transkryptu genu fuzyjnego RUNX1-RUNX1T1 w ostrej białaczce szpikowej” została przygotowana pod kierunkiem Pani prof. dr hab. n. farm. Ewy Balcerczak oraz Pani dr n. farm. Marty Żebrowskiej-Nawrockiej pełniącej rolę promotora pomocniczego. Została ona przygotowana w Pracowni Diagnostyki Molekularnej i Farmakogenomiki, Zakładu Biochemii Farmaceutycznej i Diagnostyki Molekularnej, Katedry Diagnostyki Laboratoryjnej i Molekularnej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi.

Praca doktorska została wydana w formie oprawionego maszynopisu liczącego, z pominięciem dotychczasowego dorobku i osiągnięć naukowych pana mgr Adriana Krygiera, 207 stron. Praca ma typowy układ stosowany w rozprawach doktorskich z podziałem na rozdziały: wstęp, założenia i cele pracy, materiały i metody, wyniki, dyskusja, wnioski, streszczenie (w języku polskim i angielskim), spis rycin i tabel oraz piśmiennictwo. Praca zawiera wykaz skrótów, 30 wykresów, 38 rycin oraz 32 tabele. Piśmiennictwo obejmuje 224 pozycji literaturowych pochodzących głównie z ostatnich kilku lat z dominacją literatury anglojęzycznej. Dodatkowo do pracy

dołączono wykaz publikacji i doniesień zjazdowych Doktoranta. Dorobek publikacyjny Doktoranta stanowi 6 prac opublikowanych w latach 2015-2020, z czego w przypadku 2 pozycji jest ich pierwszym autorem, 18 doniesień zjazdowych zaprezentowanych w latach 2013-2018. Ponadto Doktorant wykazał otrzymanie nagród/wyróżnień w 5 kongresach, głównie dedykowanym studentom, magistrantom i młodym lekarzom.

Tematem przedstawionej pracy jest ocena polimorfizmów, poziomu ekspresji oraz obecności produktów białkowych genów kodujących wybrane czynniki transkrypcyjne, które mogą być potencjalnie związane z powstaniem i rozwojem ostrej białaczki szpikowej (AML). Powyższy cel badawczy został zrealizowany poprzez:

1. analizę polimorfizmów pojedynczych nukleotydów oraz względnego poziomu ekspresji genów RUNX1 oraz RUNX3, przy czym w przypadku RUNX3 poddano analizie także jego produkt białkowy
2. określenie względnego poziomu ekspresji genu CEBPA wraz z oceną jego produktu białkowego
3. ocenę względnego poziomu ekspresji genu c-MYC
4. analizę obecności genu fuzyjnego RUNX1-RUNX1T1

Analiza wymienionych wyżej czynników transkrypcyjnych została wykonana na trzech poziomach molekularnych, tzn. DNA, RNA oraz końcowego produktu białkowego.

Cała rozprawa doktorska napisana jest w zwięzłym i syntetycznym stylu. W I części rozdziału I, będącym wstępem prezentowanej rozprawy, zostały przedstawione informacje dotyczące zarówno podstaw biologii jak i praktyki klinicznej AML. W drugiej części rozdziału są opisane analizowane geny: RUNX1, RUNX3, gen fuzyjny RUNX1-RUNX1T1, CEBPA, c-MYC oraz ich znaczenie dla hematopoezy i leukemogenezy. Doktorant przedstawił aktualny stan wiedzy w sposób merytoryczny i systematyczny ukazując jednocześnie wagę podjętego tematu badawczego w aspekcie poznawczym i praktycznym. Zastrzeżenia budzą pojedyncze błędy, będące najpewniej omyłkami edytorskimi, tzw. „literówki”, lub niefortunna konstrukcja gramatyczna, które niekiedy istotnie zmieniają sens przedstawianych informacji lub wypacza definicje. Należą do nich, m.in.

- strona 20: gen „blc-2” zamiast bcl-2
- strona 25: „w preparacie rozmazu krwi obwodowej obecne są komórki blastyczne” - powinno być „mogą być obecne komórki blastyczne”
- strona 36: definicja remisji choroby – pomyłono znak „<” w przypadku liczby płytek krwi i neutrofilii (powinno być „>”)
- strona 39: definicja przeszczepu od dawcy haploidentycznego nie opiera się na pochodzeniu materiału przeszczepowego z komórek krwi pępowinowej, jak to sugeruje Doktorant
- strona 41: materiałem do przeszczepu autologicznego są komórki macierzyste pobrane przed procedurą kondycjonowania do przeszczepu, a nie przed rozpoczęciem leczenia nowotworu, jak to może wynikać z tekstu
- strona 48: na podstawie cytowania Knezevici 2011 wynika, iż komórki macierzyste hematopoezy powstają ze śródbłonna naczyniowego

Wskazane powyżej uwagi i błędy edytorskie nie zmniejszają istotnie wysokiego poziomu merytorycznego tej części przedstawionej do oceny pracy doktorskiej.

W rozdziale II zostały przedstawione cele pracy oraz omówione materiały i metody oraz analiza statystyczna. Szczegółowe cele pracy zostały precyzyjnie przedstawione w pięciu punktach i poprawność ich sformułowania nie budzi wątpliwości. Charakterystyka grupy badanej została przedstawiona w kolejnym rozdziale „Wyniki”. Materiałem do badań były próbki krwi obwodowej pobrane od 46 chorych z rozpoznaniem ostrej białaczki szpikowej oraz od 60 zdrowych osób z wykluczoną chorobą nowotworową. Próbki krwi chorych z AML zostały pobrane w trakcie kontrolnych badań laboratoryjnych, jednak Doktorant nie precyzuje niestety na jakim to było etapie choroby, tzn. czy przed rozpoczęciem chemioterapii, czy może już na kolejnym etapie leczenia, kiedy obraz wyjściowy choroby mógł się zmienić? Nie została również przedstawiona liczba leukocytów oraz odsetek komórek blastycznych w analizowanych próbkach, co pozwoliłoby przypisać pochodzenie wyizolowanych kwasów nukleinowych zmienionym genetycznie komórkom nowotworowym lub

prawidłowym leukocytom we krwi obwodowej. Cennym uzupełnieniem niniejszego badania byłoby wykonanie oznaczeń także w szpiku kostnym, a jeszcze lepiej w wyizolowanych komórkach odpowiadających fenotypowo AML. Kolejnym mankamentem, zwłaszcza w kontekście przeprowadzonej analizy 3-letniego prawdopodobieństwa przeżycia w badanej grupie, jest brak informacji o występujących wyjściowo czynnikach ryzyka, profilu genetycznym oraz o stosowanej chemioterapii. Czy była ona prowadzona według tego samego protokołu? U ilu pacjentów wykonano transplantację komórek macierzystych szpiku kostnego?

Wszystkie etapy badawcze zostały prawidłowo zaprojektowane i zrealizowane w kontekście spełnienia założonych celów pracy doktorskiej. Polimorfizmy pojedynczych nukleotydów dla genów *RUNX1* (rs2268277) oraz *RUNX3* (rs6672420) zostały ocenione przy wykorzystaniu techniki PCR-RFLP. Za pomocą techniki RT-qPCR przeprowadzono analizę względnych poziomów ekspresji genów *RUNX1*, *RUNX3*, *CEBPA* oraz *c-MYC*. Obecność produktów białkowych genów *RUNX3* oraz *CEBPA* została oceniona przy wykorzystaniu metody Western-Blot. Dodatkowym ocenianym parametrem była również obecność ekspresji genu fuzyjnego *RUNX1-RUNX1T1* u pacjentów z ostrą białaczką szpikową przy użyciu metody RT-qPCR z wykorzystaniem sondy typu TaqMan. Zastosowane w pracy metody molekularne zostały bardzo szczegółowo i jednoznacznie opisane z uwzględnieniem składów mieszanin reakcyjnych oraz warunków prowadzenia reakcji dla poszczególnych metod. W niniejszej pracy doktorskiej zostały zastosowane adekwatne dla rozwiązania problemów badawczych metody statystyczne.

Uzyskane wyniki zostały zaprezentowane w rozdziale III w uporządkowany sposób, a właściwie dobrane ryciny, tabele i wykresy ułatwiają analizę wyników. W opisie wybranych polimorfizmów genów *RUNX1* oraz *RUNX3*, w kontekście bardzo małych liczebności poszczególnych podtypów AML wg FAB, niefortunne jest użycie przez Autora dosyć mocnych sformułowań takich jak, że określony genotyp najczęściej występował w danym konkretnym typie wg FAB. Przedstawienie otrzymanych wyników wyłącznie w formie tabelarycznej byłoby zupełnie wystarczające. Ponadto, nie ma żadnych podstaw, aby na podstawie uzyskanych wyników formułować tezę, iż fakt młodszego wieku zachorowania na AML osób z genotypem CC mógł warunkować jej cięższy przebieg w tej populacji. Zaprzecza temu także niski odsetek zgonów w ciągu

3 letniej obserwacji u chorych z genotypem CC w porównaniu z innymi genotypami. Podobna uwaga jak do części rozdziału przedstawiającej opisy polimorfizmów, odnosi się do sformułowań dotyczących poziomu ekspresji wybranych genów w zależności od podtypu FAB. Liczebności w poszczególnych grupach są tak małe, że nie powinno się ich klasyfikować pod względem poziomu ekspresji danego genu, co zresztą przyznał Autor odstępując od analizy istotności statystycznej.

Rozdział IV zawiera dyskusję, która jest napisana w sposób rzeczowy i wnikliwy. Wyniki uzyskane w ramach realizacji pracy doktorskiej zostały skonfrontowane z najnowszymi wynikami opublikowanych badań o podobnej tematyce. Dyskusja w pełni ukazuje bardzo dobre zorientowanie Doktoranta w aktualnej literaturze dotyczącej roli i znaczenia badanych polimorfizmów oraz czynników transkrypcyjnych w powstawaniu i przebiegu AML. Moim zastrzeżeniem jest brak w dyskusji odniesienia do analizy badanych parametrów jako potencjalnych czynników wpływających na przebieg choroby i prawdopodobieństwo przeżycia. Doktorant poprzez wyznaczenie prawdopodobieństwa przeżycia całkowitego w ciągu 3-letniej obserwacji w zależności od występowania badanych parametrów określał ich wpływ na rokowanie i przebieg AML. Trzeba jednak pamiętać, że śmiertelność w AML wynika nie tylko z biologii komórki białaczkowej, która warunkuje jej oporność na CHT, ale także z wielu innych czynników, takich jak np. powikłania toksyczne, infekcje w trakcie terapii związanej z głęboką immunosupresją, choroby współistniejące, rodzaju stosowanego leczenia itp. Dlatego poszerzenie wykonanych analiz 3-letniego przeżycia całkowitego np. o wczesną ocenę odpowiedzi na chemioterapię – osiągnięcie remisji całkowitej vs jej brak w pierwszym punkcie kontrolnym, ewent. poziom choroby resztkowej lub analiza czasu wolnego od wznowy/progresji byłaby bardziej miarodajna w określeniu znaczenia rokowniczego badanych parametrów genetycznych.

Wnioski końcowe przedstawione w rozdziale V zostały zestawione w 10 punktach i większości są uzasadnione uzyskanymi wynikami. Nie mogę się zgodzić jednak z wnioskiem, iż obecność genu fuzyjnego *RUNX1/RUNX1T1* jest korzystnym czynnikiem rokowniczym w AML, tylko na podstawie faktu, iż 2 pacjentów, u których stwierdzono powyższą mutację, przeżyło 3 lata po zakończeniu leczenia. Ponadto, nie ma podstaw do sformułowania, iż genotyp GC w przypadku genu *RUNX1* warunkuje łagodniejszy przebieg choroby, zwłaszcza, że zgodnie z wykresem 3

prawdopodobieństwo przeżycia 3 letniego jest porównywalne z genotypem GG i dużo niższe niż w genotypie CC, choć różnice nie są istotne statystycznie. Nie ma również podstaw do wnioskowania, iż wyższy względny poziom ekspresji genu *RUNX1* u kobiet może wpływać na odmienny przebieg AML u kobiet, co postuluje Autor. Pomimo tych uwag stwierdzam, iż płynące z tej pracy wnioski mają duży walor poznawczy i praktyczny. Na szczególną uwagę zasługuje potwierdzenie niekorzystnego wpływu podwyższonej ekspresji genu *RUNX3* na rokowanie, który według niektórych autorów może być biomarkerem kwalifikującym pacjentów do tzw. grupy wysokiego ryzyka, a także punktem uchwytu dla terapii celowanych. Jego definitywna rola w klinice AML nie została jednak ustalona. Tak jak stwierdza Autor, wartość prognostyczna tego oraz innych badanych parametrów wymaga potwierdzenia w dużo liczniejszych grupach pacjentów.

W końcowej ocenie uważam, iż temat podjęty przez Doktoranta jest niezwykle istotny z punktu widzenia lepszego poznania etiopatogenezy AML, a także posiada duże walory praktyczne. Podjętą próbę oceny możliwości wykorzystania analizowanych parametrów jako czynników prognostycznych AML można również potraktować jako badanie pilotażowe w ramach poszukiwania nowych, molekularnych punktów uchwytu dla terapii celowanej tej białaczki.

Podsumowując, prezentowana praca doktorska wskazuje na bardzo dobre przygotowanie teoretyczne Autora oraz opanowanie przez niego warsztatu badawczego. Wysoko oceniam zarówno wartość naukową przedstawionej pracy doktorskiej oraz jej znaczenie w praktyce klinicznej, a uwagi przedstawione w recenzji nie mają istotnego wpływu na wysoką ocenę tej rozprawy.

Praca doktorska pt.: „Ocena ekspresji i polimorfizmów genów, kodowanych przez nie czynników transkrypcyjnych oraz transkryptu genu fuzyjnego *RUNX1-RUNX1T1* w ostrej białaczce szpikowej” spełnia wszystkie wymagania stawiane rozprawom doktorskim, dlatego wnoszę o dopuszczenie Pana magistra Adriana Krygiera do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Dr hab. n. med. Radosław Chaber, prof. UR