

Warszawa 30.07.2021

**Recenzja rozprawy doktorskiej magister Katarzyny Błachnio pt.
„Cytometryczno - cytogenetyczne czynniki prognostyczne w
przewlekłej białaczce limfocytowej oraz zmiany subpopulacji
limfocytów krwi w trakcie leczenia o potencjalnym znaczeniu
prognostycznym” przygotowanej pod kierunkiem dr hab. med.
Grzegorza Rymkiewicza**

Przewlekła białaczka limfocytowa (*chronic lymphocytic leukemia*, CLL) jest najczęstszą białaczką diagnozowaną w społeczeństwach półkuli zachodniej. Dzięki lepszemu poznaniu biologii CLL w ostatnich latach nastąpił istotny postęp w leczeniu tej choroby, polegający przede wszystkim na coraz szerszym wprowadzaniu nowych terapii celowanych, takich jak inhibitory przekazywania sygnału przez receptor B (*B-cell receptor inhibitors*, BCRi) jak również antagoniści białka BCL2. Nadal jednak immunochemioterapia z przeciwciałami monoklonalnymi antyCD20 odgrywa istotną rolę, szczególnie w leczeniu pierwszej linii u chorych z brakiem delekcji 17p / mutacji TP53 i niezmutowanym statusem genów dla IGVH (*immunoglobulin variable heavy chain*). W schematach chemioterapii często stosowane są fludarabina w połączeniu z rytuksymabem oraz bendmustyna. Niezwykle heterogeny przebieg kliniczny CLL sprawia, że od lat prowadzone są badania nad czynnikami prognostycznymi i predykcyjnymi, warunkującymi czas przeżycia chorych, jak również odpowiedź na leczenie. Przewlekła białaczka limfocytowa wiąże się z licznymi zaburzeniami w układzie odporności, których wpływ na przebieg kliniczny choroby wciąż nie jest w pełni poznany. Biorąc pod uwagę powyższe względy uważam, że przedmiot badań przeprowadzonych w ramach pracy doktorskiej jest ciekawy i aktualny.

Praca ma układ typowy dla rozprawy doktorskiej i zawiera 149 stron tekstu, 34 ryciny i 14 tabel. Spis piśmiennictwa obejmuje 213 odpowiednio dobranych i cytowanych pozycji.

Wstęp liczący 19 stron stanowi doskonale wprowadzenie do dalszej części rozprawy. Doktorantka omawia dane dotyczące epidemiologii przewlekłej białaczki limfocytowej, objawy kliniczne, klasyfikacje zaawansowania klinicznego i czynniki rokowniczych. Następnie przedstawia leki stosowane w terapii PBL (warto byłoby w tym miejscu wspomnieć o nowych BCRi, takich jak zarejestrowany w krajach EU akalabrutynib) oraz mechanizm działania przeciwciał monoklonalnych. Ostatnią część Wstępu stanowi omówienie zaburzeń w układzie immunologicznym w przebiegu PBL. Warto podkreślić doskonałą znajomość zagadnień klinicznych, pomimo, że Doktorantka nie jest lekarzem. Badania przeprowadzone w ramach pracy doktorskiej podzielono na dwie części, w pierwszej oceniano wartość rokowniczą parametrów cytometrycznych i cytogenetycznych oraz ich wzajemne zależności. W drugiej części badano czy testem wrażliwości *in vitro* można przewidzieć wyniki leczenia, analizowano również zmiany w populacjach limfocytów krwi obwodowej po kolejnych cyklach leczenia. Cele pracy zostały sformułowane w jasny i czytelny sposób.

W części metodycznej Autorka dokładnie opisuje zastosowane techniki badawcze, cytometrię przepływową, która była wykorzystana do diagnostyki PBL, oceny liczby komórek NT i NKT oraz określenia żywotności komórek białaczkowych pod wpływem mieszaniny leków stosowanych w leczeniu chorych na PBL: rytuksymabu i bendamustyny oraz rytuksymabu, fludarabiny i mafosfamid (aktywna postać cyklofosfamid). Do oceny kariotypu i aberracji cygenetycznych wykorzystano metodę FISH. Opis metodyki wskazuje na doskonałą opanowanie oraz biegłość w posługiwaniu się techniką cytometrii przez doktorantkę. Innowacyjnym aspektem badań jest ocena czterech populacji komórek NK i NKT różniących się poziomem ekspresji CD56, która nie została opisana w dostępnej literaturze, podobnie jak dokonana przez Autorkę systematyczna analiza zmian w populacjach komórek T, NK i NKT przed w trakcie i po zakończeniu leczenia immunochemioterapią. W opisie grupy badanej należałoby opisać dokładniej opisać z czego wynikał podział na dwie podgrupy, jest to przedstawione dokładniej dopiero w rozdziale Wyniki. W pracy zastosowano prawidłowo dobrane metody analizy statystycznej.

Badania przeprowadzone w ramach pracy doktorskiej przyniosły wiele interesujących wyników. W pierwszej części analiz wykazano istotne korelacje między parametrami cytometrycznymi (zarówno w odniesieniu do liczby komórek z ekspresją badanych antygenów jak i MFI) a parametrami cytogenetycznymi o znaczeniu rokowniczym. W drugiej części Autorka wykazała powiązania między parametrami cytometrycznymi i cytogenetycznymi a czasem przeżycia chorych. Ciekawe są m.in. obserwacje dotyczące związku między niską wartością MFI CD20 a obecnością delekcji 11q oraz dłuższego prognozowanego czasu przeżycia u chorych z wyższymi wartościami MFI CD20. W drugiej części badań stwierdzono istotne różnice między pacjentami w odniesieniu do wrażliwości na leczenie oraz korelacje między odpowiedzią na leczenie *in vitro* i *in vivo*, co sugeruje, że ocena żywotności komórek mogłaby być przydatna do prognozowania wyników leczenia *in vivo*, pozwalając uniknąć toksyczności leczenia. Ma to szczególne znaczenie dla polskich chorych z uwagi na nadal ograniczony dostęp do nowych terapii celowanych

Wyniki trzeciej części doświadczeń pokazują, że zaburzenia w układzie odporności występują już we wczesnej fazie CLL dotycząc między innymi niższej liczby prawidłowych limfocytów B i komórek NKT oraz wyższej liczby komórek NKT^{dim} u nieleczonych chorych na PBL. Autorka wykazała również wykładnicze obniżenie liczby komórek białaczkowych oraz limfocytów T, komórek NK i NKT w trakcie leczenia immunochemioterapią. Interesujący jest wzrost względnej liczby komórek NKCD56^{bright} po kolejnych liniach leczenia, który może następować pod wpływem obecnych we krwi obwodowej komórek CLL. W trakcie leczenia obserwowano również zmniejszenie liczby limfocytów T, komórek NK, NKCD56^{dim}, NKT i NKTCD56^{dim}. Monitorowanie określonych populacji limfocytów mogłoby być nie tylko wskazówką rokowniczą, ale również dostarczyć informacji na temat potrzeby profilaktyki przeciwinfekcyjnej. Na uznanie zasługuje bardzo duża liczba doświadczeń wykonanych w ramach rozprawy, obejmujących zarówno parametry o znaczeniu diagnostycznym, rokowniczym jak i zmiany zachodzące pod wpływem leczenia oraz korelacje między wynikami badań *in vitro* i leczeniem *in vivo*. Doktorantka uzyskała bardzo interesujące wyniki, a dyskusja nad nimi świadczy o dojrzałości naukowej i umiejętności konfrontacji rezultatów własnych doświadczeń z danymi przedstawionymi przez innych autorów jak również wyciągania wniosków. Nieco zastrzeżeń budzą ostateczne wnioski przedstawione na końcu rozprawy, które są zbyt rozbudowane stanowią w znacznej mierze powtórzenie wyników.

Podsumowując, uważam, że przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska mgr Katarzyny Błachnio pt „Cytometryczno - cytogenetyczne czynniki prognostyczne w przewlekłej białaczce limfocytowej oraz zmiany subpopulacji limfocytów krwi w trakcie leczenia o potencjalnym znaczeniu prognostycznym” spełnia warunki określone w art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (t.j. Dz. U. Z 2017r., poz. 1789). W mojej opinii analizy przeprowadzone w ramach pracy doktorskiej przyniosły wyniki o istotnym znaczeniu poznawczym w odniesieniu do biologii i czynników rokowniczych w PBL jak również korelacji między wrażliwością na leczenie *in vitro* i *in vivo* a także zmian zachodzących w wybranych populacjach limfocytów w trakcie leczenia białaczki. Doktorantka wykazała się doskonałą znajomością zagadnień dotyczących przedmiotu badań, opanowaniem laboratoryjnych technik badawczych oraz umiejętnością interpretacji wyników i poprowadzenia dojrzałej dyskusji. Z uwagi na powyższe mam zaszczyt przedłożyć Radzie Naukowej Narodowego Instytutu Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie – Państwowego Instytutu Badawczego wniosek o dopuszczenie mgr Katarzyny Błachnio do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Warszawa 30.07.2021

