

Kraków, 14 lutego 2022 r.

Prof. dr hab. n. med. Marek Sanak
Zakład Biologii Molekularnej i Genetyki Klinicznej
II Katedra Chorób Wewnętrznych im. Prof. Andrzeja Szczeklika
Uniwersytet Jagielloński – Collegium Medicum

Na podstawie powołania przez Radę Naukową Narodowego Instytutu Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie – Państwowego Instytutu Badawczego (nr Uchwały 92/2021 z dnia 17.11.2021) na recenzenta w postępowaniu w sprawie nadania stopnia doktora habilitowanego w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu, w dyscyplinie nauki medyczne Pani dr Beacie Grygalewicz przedkładam recenzję osiągnięcia naukowego i całościowego dorobku naukowego Habilitantki.

Pani dr Beata Grygalewicz jest absolwentką Wydziału Biologii Uniwersytetu Warszawskiego, na którym uzyskała tytuł zawodowy magistra biologii w 1995 r. W roku 2003 uchwałą Rady Naukowej Centrum Onkologii – Instytutu im. Marii Skłodowskiej-Curie uzyskała stopień naukowy doktora nauk medycznych w dziedzinie biologia medyczna, na podstawie rozprawy zatytułowanej „*Określenie regionów amplifikacji krótkiego ramienia chromosomu 12 w guzach jądra człowieka*”. Promotorem pracy był Pan prof. dr hab. n. med. Janusz Siedlecki. Habilitantka jest aktywną zawodowo diagnostą laboratoryjnym, w roku 2006 uzyskała tytuł specjalisty w dziedzinie laboratoryjnej genetyki medycznej.

Karier zawodowa Habilitantki jest związana z Centrum Onkologii w Warszawie. Jest zatrudniona od nieprzerwanie od ukończenia studiów w Pracowni Cytogenetyki Centrum Onkologii – Instytutu im. Marii Skłodowskiej-Curie, początkowo jako specjalista, następnie asystent naukowy, a po uzyskaniu tytułu doktora jako adiunkt. Kieruje Samodzielną Pracownią Cytogenetyki Instytutu od roku 2019.

Omówienie osiągnięcia naukowego Pani dr Beaty Grygalewicz

Jako osiągnięcie habilitacyjne Pani dr Beata Grygalewicz przedstawiła cykl publikacji zatytułowany „*Cytogenetyczna charakterystyka nowej jednostki WHO 2017 Chłoniak Burkitt-like z aberracją 11q – implikacje diagnostyczno-kliniczne*”. W skład osiągnięcia zaliczyła 5

publikacji w tym 4 prace oryginalne, które się ukazały drukiem w latach 2011-2020. Publikacje te łączy zagadnienie szczególnej postaci nieziarniczego chłoniaka B-komórkowego, fenotypowo podobnego do chłoniaka Burkitta. Pani dr Beata Grygalewicz była współautorką jednej z pierwszych na świecie publikacji opisujących charakterystyczne dla tego nowotworu somatyczne mutacje chromosomowe ramienia 11q.

W pracy opublikowanej w **Medical Oncology (2011, IF=2,140)** Pani dr Beata Grygalewicz była współautorem odkrycia u 4 chorych na nieziarniczego chłoniaka B-komórkowego charakterystycznej somatycznej mutacji chromosomowej. Polegała ona na obecności częściowej duplikacji regionu q23q13 chromosomu 11, przy równoczesnym braku typowej dla chłoniaka Burkitta translokacji angażującej *MYC*. Klasycznym badaniem histopatologicznym materiału z biopsji chorzy mieli postawione rozpoznanie chłoniaka Burkitta. W każdym z przypadków komórki nowotworu zostały poddane badaniu technikami immunohistochemicznymi oraz immunofenotypowymi z zastosowaniem cytometrii przepływowej. Ich wynik sugerował rozpoznanie nieziarniczego chłoniaka o cechach pośrednich chłoniaka rozlanego z dużych komórek B i chłoniaka Burkitta. Połączenie tych cech fenotypowych chłoniaka z charakterystyczną rearanżacją chromosomową pozwoliło na zaproponowanie kliniczno-patologicznej podjednostki w obrębie chłoniaków nieziarniczych, z charakterystyczną mutacją ulokowaną na długim ramieniu chromosomu 11. W owym czasie była to rzadka obserwacja, w bazie danych Cancer Genome Anatomy Project było opisanych wcześniej tylko 6 przypadków takiej rearanżacji. Uwagę zwraca bardzo umiejętne wykorzystanie techniki hybrydyzacji in situ, pozwalające nie tylko na udokumentowanie częściowej duplikacji ramienia długiego chromosomu 11, lecz również ujawnienie inwersji zduplikowanego fragmentu. Praca ta od czasu jej opublikowania była cytowana 27 razy.

Kolejna publikacja z cyklu osiągnięcia naukowego Pani dr Beaty Grygalewicz ukazała się w czasopiśmie **American Journal of Clinical Pathology (2018, IF=1,962)**. W tym czasie Światowa Organizacja Zdrowia zaproponowała już tymczasowo odrębną jednostkę chorobową, nazwaną chłoniakiem podobnym do Burkitta z obecnością rearanżacji chromosomu 11q. Omawiana publikacja, w której Pani dr Beata Grygalewicz jest pierwszą autorką, przedstawia wyniki badań grupy 11 chorych z tym właśnie wariantem chłoniaka nieziarniczego. Metodologia badań została poszerzona o hybrydyzacyjną technikę molekularną mikromacierzowego porównawczego badania całogenomowego oraz badania polimorfizmu pojedynczego nukleotydu. Istotnym celem tej pracy było wykazanie, że rearanżację chromosomowe 11q nie są swoiste dla chłoniaków podobnych do Burkita. W

przeprowadzonych badaniach uwzględniono bowiem pięć przypadków chłoniaka B-komórkowego o wysokim stopniu złośliwości, w których ta somatyczna mutacja chromosomowa również była obecna. Wnioski płynące z wyników przeprowadzonych badań podważają istnienie osobnej jednostki chorobowej charakteryzującej się obecnością rearanżacji 11q. Wykazano bowiem jej obecność również u chorych na chłoniaka Burkitta z obecną translokacją *MYC*, oraz w przypadku chłoniaków B-komórkowych o wysokim stopniu złośliwości. Inną ważną obserwacją na poziomie molekularnym było stwierdzenie braku stałych punktów złamań chromosomu 11, a także obligatoryjna obecność terminalnej delecji tego chromosomu, w jednym przypadku zastąpionej przez uniparentalną disomią. Ciekawa była również sugestia o korelacji kliniczno-patologicznej dużego rozmiaru guza z mniejszym obszarem duplikacji i z powieleniem kopii genu kodującego MLL-1 (*KMT2A1*).

W publikacji, która się ukazała w czasopiśmie **Cancer Genetics (2020, IF= 3,105)** Pani dr Beata Grygalewicz przedstawiła opis przypadku chorego, u którego doszło do progresji chłoniaka typu Burkitt-like z rearanżacją chromosomu 11q. Na podstawie dwukrotnego badania w czteromiesięcznym odstępie czasu wykazano rozrost nowotworu ze zwiększeniem odsetka komórek mających amplifikację *MYC*. Pani dr Beata Grygalewicz, będąca pierwszym autorem tej pracy zaproponowała, że obecność amplifikacji *MYC* należy uznać za marker złego rokowania i oporności chłoniaka na chemioterapię. Unikatowości tego opisu przypadku dodaje fakt, że do rozwoju nieziarniczego chłoniaka doszło u chorego, który z powodu choroby z autoimmunoagresji powodującej schyłkową niewydolność nerek miał przeszczepienie narządu z następową immunosupresją. Podobnie, jak w poprzedniej z omawianych prac, przedstawiono w publikacji bardzo dobrą charakterystykę immunofenotypową komórek nowotworowych oraz czytelną dokumentację wyników badań technikami FISH i aCGH.

Czwarta z publikacji włączona w cykl osiągnięcia naukowego Pani dr Beaty Grygalewicz ukazała się w czasopiśmie **Modern Pathology (2018, IF=6,365)**. Habilitantka jest drugą w kolejności autorów tej publikacji, w której powstaniu współuczestniczyli również badacze z Hiszpanii i Niemiec. Tematem publikacji jest porównawcza charakterystyka immunofenotypowa komórek chłoniaka Burkitta. Dzięki połączeniu wyników analiz cytometrii przepływowej z immunohistochemią oraz z wynikami cytogenetyki molekularnej Autorom udało się zaproponować algorytm diagnostyczny pozwalający na odróżnienie chłoniaka Burkitta od chłoniaka Burkitt-like z obecnością rearanżacji chromosomu 11q. Różnica była niewielka, polegała na braku ekspresji CD16/CD56 i większej ekspresji CD38 w

przypadku klasycznego chłoniaka Burkitta. Uprzednio opisana różnica polegająca na braku antygeny LMO2 w immunohistochemii chłoniaka Burkitta, przy jego obecności w przypadku chłoniaka Burkitt-like z rearanżacją 11q wydawała się mieć mniejszą wartość diagnostyczną. Cenny aspektem tej pracy jest uwzględnienie danych kliniczno-patologicznych chorych, w szczególności informacji o dobrej odpowiedzi na chemoterapię w przypadku chłoniaka Burkitt-like, o ile była ona stosowana według takich samych schematów jak w chłoniaku Burkitta.

Ostatnia z publikacji omawianego cyklu osiągnięcia naukowego jest pracą poglądową indywidualnego autorstwa Pani dr Beaty Grygalewicz, która się ukazała w czasopiśmie **Acta Hematologica Polonica (2019, IF=0, MNiSW=20)**. Praca jest polskojęzyczna i prezentuje miejsce cytogenetyki molekularnej w diagnostyce i rozróżnianiu chłoniaków nieziarniczych. Pani dr Beata Grygalewicz przedstawia w zwięzły sposób aktualną klasyfikację WHO chłoniaków nieziarniczych B-komórkowych, również w kontekście ich epidemiologii, aktualnie stosowanych schematów chemioterapii i rokowania. Następnie opisała laboratoryjne algorytmy diagnostyczne z wykorzystaniem hybrydyzacji *in situ* dla wykrycia translokacji *MYC*, *BCL6* lub *BCL2* albo amplifikacji *MYC*. W pracy przedstawia również komplementarność technik FISH i aCGH dla rozpoznania chłoniaka Burkitt-like z rearanżacją 11q.

Podsumowując osiągnięcie naukowe Pani dr Beaty Grygalewicz, jest ono spójnym cyklem publikacji dotyczącym laboratoryjnej diagnostyki różnicowej nieziarniczych chłoniaków B-komórkowych u dorosłych. Zastosowane techniki badawcze, obok cytogenetyki klasycznej uwzględniają nowoczesną cytogenetykę molekularną. Są to rozdzielcze sondy znakowane fluorescencyjnie, które się sprawdzają w hybrydyzacji *in situ* jąder interfazowych i hybrydyzacji chromosomów metafazowych. Odpowiednio dobrane, w szczególności dla minimalnego regionu duplikacji i regionu telomerowej delecji, są cennym narzędziem do rozpoznania chłoniaka Burkitt-like z rearanżacją 11q. Wielkość obszarów ulegających duplikacji i inwersji oraz terminalnej delecji długiego ramienia chromosomu 11 można precyzyjnie wyznaczyć na podstawie mikromacierzowej porównawczej hybrydyzacji genomowej. Wykorzystanie zestawu sond wykrywających również częstsze warianty polimorfizmu pojedynczego nukleotydu, umożliwiły w jednym przypadku wykazanie izodysomii jednorodzicielskiej, przy braku terminalnej delecji 11q. Pani dr Beata Grygalewicz jest pierwszą autorką w trzech publikacjach, przy czym jedna z publikacji jest opisem przypadku, a druga jest pracą poglądową. Wartość osiągnięcia naukowego podnosi

dobra współpraca z Panem dr hab. Grzegorzem Rymkiewiczem, który kieruje Pracownią Cytometrii Przepływowej Narodowego Instytutu Onkologii w Warszawie. Dzięki tej współpracy udało się zdefiniować subtelne różnice między komórkami chłoniaka Burkitta a komórkami Burkitt-like z rearanżacją 11q.

Z uwag dotyczących osiągnięcia naukowego pragnę podkreślić, że znaczenie klinicznego wyróżnienia proponowanej jednostki chorobowej Burkitt-like z obecnością rearanżacji 11q pozostaje dla mnie niewystarczająco wyjaśnione. Wyniki przedstawione przez Habilitantkę, oraz nieliczne prace naukowe opublikowane w literaturze światowej a dotyczące tej samej tematyki wskazują na możliwość występowania tej złożonej mutacji chromosomowej chromosomu 11 w innych postaciach nieziarniczego chłoniaka B-komórkowego, w tym również u dzieci z rozsiewem uogólnionym. Jeśli wykazanie tej mutacji chromosomowej byłoby wskazówką do wdrożenia schematu chemioterapii typowego dla chłoniaka Burkitta w celu osiągnięcia najlepszych wyników leczenia, wskazana byłaby może metaanaliza opublikowanych przypadków choroby, które są w materiale Habilitantki nieliczne. Zauważalny jest również brak szerszego spojrzenia na rolę delecji długiego ramienia chromosomu 11 i jej korelacje kliniczno-patologiczne. Duża zmienność regionu proksymalnego 11q, który ulega duplikacji oraz inwersji, przemawia za być może istotniejszą rolą terminalnej delecji tego chromosomu. Pomocny w takich rozważaniach byłby fakt występowania częstej delecji 11q w najbardziej zaawansowanych postaciach innego nowotworu – nerwiaka zarodkowego, co ciekawe szczególnie gdy nie stwierdzono somatycznej amplifikacji *MYCN*.

Inne osiągnięcia naukowe Pani dr Beaty Grygalewicz

Prace badawcze Habilitantki, poza osiągnięciem naukowym do stopnia doktora habilitowanego, również się mieszczą w tematyce cytogenetyki nowotworów człowieka. Pani dr Beata Grygalewicz kontynuowała podjęte jeszcze przed doktoratem badania nad mutacjami chromosomowymi w guzach jądra. Na szczególną uwagę zasługuje publikacja z **Cancer Research (2005, IF=7,616)**, w której wraz z zespołem Institute of Cancer Research w Sutton opisała częsta cytogenetyczną amplifikację chromosomu 4q12 w nasieniakach, wskazując na protoonkogen KIT jako krytyczny gen tego regionu. Technikami cytogenetycznymi badała również guzy jajnika (**Cancer Genetics and Cytogenetics, 2009, IF=1,537**). Większość publikacji naukowych Pani dr Beaty Grygalewicz dotyczy cytogenetyki chorób nowotworowych układu krwiotwórczego. Wśród publikacji jest np. interesujący opis mutacji

chromosomowych w przewlekłych białaczka limfatycznych CLL/SLL analizowanych również technikami cytogenetyki molekularnej (**Molecular Cytogenetics, 2016, IF=1,455**).

Łączny dorobek naukowy Pani dr Beaty Grygalewicz obejmuje 43 publikacje, w tym 29 prac w czasopismach mających przyznany wskaźnik oddziaływania. Zdecydowana większość tych prac została opublikowana po uzyskaniu stopnia doktora. Habilitantka jest również autorką 4 rozdziałów monografii, w tym jednej w języku angielskim i jednego w skrypcie. Jej zaangażowanie w aktywność naukową jest dobre, jest autorką lub współautorką 75 doniesień zjazdowych, których liczba po uzyskaniu stopnia doktora nauk medycznych podwoiła się. Około połowa tych doniesień zjazdowych i konferencyjnych była prezentowana na zjazdach międzynarodowych. Biorąc pod uwagę sumaryczny wskaźnik oddziaływania czasopism, w których się ukazały prace autorstwa i współautorstwa Pani dr Barbary Grygalewicz, jej dorobek naukowy jest istotny w skali międzynarodowej i uległ znacznemu zwielokrotnieniu po uzyskaniu stopnia doktora nauk medycznych. Fakt ten potwierdza indeks Hirscha osiągający wartość 13.

Pani dr Barbara Grygalewicz opanowała arkana cytogenetyki molekularnej w najlepszych naukowych ośrodkach Europy. Przybywała na stażach naukowych w Holandii, w Zakładzie Genetyki Człowieka KUL w Leuven w latach 1997 oraz 2001/2002. Była podczas drugiego tamże pobytu stypendystką programu naukowego Unii Europejskiej, współpracowała również z innym renomowanym holenderskim ośrodkiem cytogenetyki nowotworów w Nijmegen. Jako post-doc pracowała w latach 2003-2004 w Instytucie Badań nad Rakiem w Sutton, Wielka Brytania oraz współpracowała z londyńskim Barts and The London Queen Mary's School of Medicine. Podkreślić również należy wieloletnią współpracę naukową Habilitantki z Zakładem Cytogenetyki Molekularnej Uniwersytetu Klinicznego w Jenie. Wszystkie wymienione współprace z ośrodkami zagranicznymi są udokumentowane wspólnymi publikacjami.

Habilitantka współpracuje także z wiodącymi w Polsce ośrodkami cytogenetyki molekularnej, by wymienić Zakład Genetyki Medycznej Instytutu Matki i Dziecka, Pracownię Genetyki Instytutu Hematologii i Transfuzjologii w Warszawie oraz Zakład Diagnostyki Molekularnej Świętokrzyskiego Centrum Onkologii. Podobnie jak w przypadku współpracy międzynarodowej, międzyośrodkowe badania krajowe są również udokumentowane wspólnymi publikacjami.

Działalność dydaktyczna Pani dr Beaty Grygalewicz obejmuje promotorstwo jednej pracy magisterskiej, opiekę i funkcję kierownika dla 5 osób specjalizujących się w laboratoryjnej genetyce medycznej, a także indywidualne szkolenia kilku pracowników uczelni naukowych i podmiotów leczniczych.

W ramach działalności organizacyjnej pomagała zorganizować laboratorium cytogenetyczne Szpitala Specjalistycznego w Brzozowie, była współorganizatorem międzynarodowego spotkania towarzystwa naukowego oraz krajowych warsztatów naukowych. Jest też stałym współorganizatorem programu kontroli jakości w badaniach diagnostycznych technikami cytogenetyki molekularnej.

Realizowała jako kierownik projekt naukowy finansowany przez pozarządową fundację im. Jakuba Hr. Potockiego oraz projekt finansowany przez Polskie Towarzystwo Onkologiczne. Jest obecnie kierownikiem projektu badawczego finansowanego przez jej Instytut Badawczy. Uczestniczy jako diagnosta w badaniach lekowych realizowanych w Instytucie Onkologii w Warszawie.

Pani dr Beata Grygalewicz została wyróżniona nagrodą imienia prof. Danuty Rożynkowej, przyznawaną przez Sekcję Cytogenetyki Hematoonkologicznej PTGC za badania dotyczące mutacji chromosomowej 11q w chłoniakach B-komórkowych.

W podsumowaniu, Pani dr Beata Grygalewicz przedstawiła osiągnięcie naukowe będące spójnym cyklem badań naukowych, które prowadziła po uzyskaniu stopnia doktora nauk medycznych. Laboratoryjny warsztat naukowy Pani dr Beaty Grygalewicz obejmuje nowoczesną cytogenetykę molekularną ukierunkowaną na badanie mutacji somatycznych w komórkach nowotworowych. Jej praca naukowa łączy walory diagnostyczne, jest bowiem diagnostą laboratoryjnym w zakresie diagnostyki genetycznej i kierownikiem pracowni diagnostycznej o kapitalnym znaczeniu w procesie rozpoznania i leczenia chorób nowotworowych w jej macierzystej jednostce. Wykorzystała wiedzę nabytą podczas staży zagranicznych i wprowadziła do pracowni techniki hybrydyzacji in situ oraz mikromacierzowej całogenomowej hybrydyzacji porównawczej, które wykorzystuje w swoich badaniach. Jest współodkrywcą wariantu chłoniaka B-komórkowego z powtarzalną mutacją chromosomową regionu 11q, którego przeprowadziła pionierską charakterystykę

cytogenetyczną, a także we współpracy z Pracownią Cytometrii Przepływowej Narodowego Instytutu Onkologii zaproponowała różnicowy algorytm diagnostyczny oparty na oznaczeniu immunofenotypu komórek nowotworu.

Na podstawie załączonej starannie przygotowanej dokumentacji postępowania habilitacyjnego obejmującej listę publikacji i wskaźniki bibliometryczne Pani dr Beaty Grygalewicz oceniam jej osiągnięcia naukowe bardzo dobrze. Po uzyskaniu stopnia doktora powiększyła wielokrotnie swój dorobek publikacyjny. Przedstawiony cykl publikacji osiągnięcia naukowego jest oryginalnym i nowatorskim rozwiązaniem naukowym, dostrzeżonym w skali międzynarodowej przez innych badaczy.

Opinia końcowa w sprawie nadania Pani dr Beata Grygalewicz stopnia doktora habilitowanego w dziedzinie nauk medycznych, w dyscyplinie medycyna.

W nawiązaniu do powyższych pozytywnych ocen częściowych uprzejmie proszę Pana Przewodniczącego Rady Naukowej Narodowego Instytutu Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie – Państwowego Instytutu Badawczego o przyjęcie mojej pozytywnej opinii w sprawie nadania Pani dr Beacie Grygalewicz stopnia doktora habilitowanego.


Marek Sanak