

Prof. dr hab. med. Iwona Hus

Klinika Hematologii

Państwowy Instytut Medyczny MSWiA

Recenzja rozprawy doktorskiej lek. Małgorzaty Gajewskiej pt.
„Zastosowane oceny stref organizatorów jąderkotwórczych (AgNOR ang.
argyrophilic nucleolar organizer region) w ostrych białaczkach”
przygotowanej pod kierunkiem prof. dr hab. n. med. Kazimierza Sułka

Ostre białaczki to heterogenna grupa nowotworów, wśród których wyróżniamy ostre białaczki szpikowe (*acute myeloid leukemias*, AML) i ostre białaczki limfoblastyczne *acute lymphoblastic leukemias*, ALL). Aktualne klasyfikacja ostrych białaczek wg WHO z 2022 oraz ELN/ICC z roku 2022 oparte są na obecnościokreślonych zmian genetycznych, podczas gdy wcześniej obowiązująca klasyfikacja FAB (francusko-amerykańsko-brytyjska) opierała się na cechach morfologicznych, cytochemicznych i immunofenotypowych komórek białaczkowych. Ocena cytogenetyczna i molekularna ma zatem obecnie podstawowe znaczenie w diagnostyce ostrych białaczek – nie tylko z uwagi na rokowanie, ale, co jest szczególnie istotne z uwagi na możliwość zastosowania terapii ukierunkowanych molekularnie. Pomimo obserwowanego w ostatnich latach postępu w terapii, rozpoznanie ostrej białaczki wiąże się zwykle z bardzo niekorzystnym rokowaniem, które jest dodatkowo zależne od wieku oraz stanu wydolności i chorób współistniejących pacjenta. Nadal prowadzonych jest wiele badań nad określeniem czynników, które pozwoliłyby na dokładniejszą ocenę rokowania u poszczególnych pacjentów. W swoich badaniach Doktorantka zajęła się mało poznanym zagadnieniem - oceną wybarwionych azotanem srebra regionów organizujących jąderko (AgNOR) w komórkach białaczkowych u dorosłych chorych na ostre białaczki, a celem pracy było ustalenie czy ocena ta mogłaby być przydatna w różnicowaniu ostrych białaczek oraz w połączeniu z analizą zaburzeń cytogenetycznych mogłaby umożliwić szybką

ocenę grupy ryzyka. Przesłanką do przeprowadzenia badań były obserwacje, które wykazały, że każdy typ komórek w szpiku ma charakterystyczne struktury AgNOR oraz że wielkość i kształt AgNOR koreluje z aktywnością transkrypcyjną i proliferacyjną komórek. Opublikowano dane dotyczące prognostycznej wartości oceny białek AgNOR u chorych na nowotwory piersi, gruczołu krokowego, płuc, szpiczaka i chłoniaków. Biorąc pod uwagę bardzo niewielką liczbę publikacji dotyczących oceny AgNOR u chorych na ostre białaczki temat pracy uważam za oryginalny i bardzo interesujący. We Wstępie pracy autorka w sposób szczegółowy i przejrzysty wprowadza czytelnika w zagadnienie dotyczące AgNOR, przedstawiając historię odkrycia, definicje, metody oznaczania. Omawia również wyniki dotychczas przeprowadzonych badań u chorych na nowotwory hematologiczne. Rozprawa doktorska przygotowana została na podstawie trzech powiązanych tematycznie prac oryginalnych opublikowanych w recenzowanych czasopismach naukowych ujętych w ministerialnym wykazie czasopism naukowych:

1. **Gajewska M**, Rutkowska E, Kwiecień I, Rzepecki P, Sułek K.: Analysis of Argyrophilic Nucleolar Organizer Regions (AgNORs) in Acute Leukemia in Adults. *Diagnostics* (Basel). 2022 Mar 28;12(4):832.
2. **Gajewska M**, Kwiecień I, Rutkowska E, Rzepecki P, Sułek K.: AgNOR patterns and configurations in adult acute leukemia patients. *Cent Eur J Immunol*. 2022;47(4):323-331.
3. **Gajewska M**, Rutkowska E, Kwiecień I, Rzepecki P, Sułek K.: Can AgNOR counts and configuration predict complete remission in adult acute myelogenous leukemia patients? *Lek. Wojsk*. 2022; 100(3),177 – 180.

W pierwszej i drugiej publikacji materiał badany stanowiły rozmazy szpiku uzyskanego od 70 chorych na ostre białaczki, w tym 45 chorych na AML i 25 chorych na ALL leczonych w Klinice Chorób Wewnętrznych i Hematologii WIM w latach 2017-2021. Wykorzystano kryteria rozpoznania oparte na klasyfikacji WHO 2016 oraz klasyfikację FAB. Do oceny grupy ryzyka wykorzystano klasyfikację cytogenetyczną ELN 2017 (*European Leukemia Net*). W trzeciej publikacji grupę badaną stanowiło 24 chorych na AML. Analizę AgNOR przeprowadzono z wykorzystaniem komputerowego systemu analizy obrazu *Cll Soft Imaging System*. Oceniano średnią liczbę AgNOR w jądrze, średnią powierzchnię AgNOR oraz stosunek powierzchni AgNOR do powierzchni jądra komórkowego. Struktury i układy ziarnistości AgNOR w komórkach blastycznych kwalifikowano wg systemu Nikicza w modyfikacji własnej – wyróżniono dwie grupy

AgNOR w zależności od wielkości ich powierzchni. Do grupy 1 kwalifikowano AgNOR o kształcie kropek i nieregularnej powierzchni do $4,5 \mu\text{m}^2$. W zależności od wielkości kropki kwalifikowano jak małe, średnie i duże (*small, medium i large dots*, SD, MD i LD odpowiednio). Do grupy II kwalifikowano AgNOR o kształcie regularnych (małych - SRB i dużych LRB) i nieregularnych (małych SIB i dużych LIB) pęcherzyków o wielkości $> 4,5 \mu\text{m}^2$. Oceniano również rozkład przestrzenny struktur AgNOR, wyróżniając konfigurację prostą, mieszaną i złożoną. Metodyka jest adekwatna do założonego celu, opisana w sposób przejrzysty i kompetentny, w pracy zastosowano prawidłowe metody statystyczne.

Badania przeprowadzone przez Doktorantkę przyniosły wiele interesujących nowych danych dotyczących znaczenia analizy AgNOR u chorych na ostre białaczki. W pierwszej publikacji wykazano wyższe wartości wszystkich mierzonych parametrów u chorych a AML w porównaniu do ALL. W grupie chorych z AML wykazano wyższe średnie wartości powierzchni AgNOR w grupie ELN3 w porównaniu do ELN2. Wyższą średnią liczbę AgNOR wykazano zarówno w przypadku wyższej liczby WBC jak i wyższego odsetka blastów we krwi obwodowej. W grupie chorych na ALL stosunek powierzchni AgNOR do powierzchni jądra był wyższy u chorych z obecnością chromosomu Filadelfia. Dane te pokazują różnice w AgNOR zarówno u chorych z AML i ALL, jak również w przypadku mniejszej masy guza u chorych na AML.

W drugiej publikacji wykazano istotną różnicę w rozkładzie konfiguracji AgNOR prostych, mieszanych i złożonych między chorymi na AML i ALL, jak również u chorych na AML w zależności od grupy ryzyka cytogenetycznego. Z uwagi na duży międzyosobniczy rozrzut częstości występowania poszczególnych wskaźników AgNOR nie znaleziono takiego zestawu cech, który byłby charakterystyczny dla określonej grupy ryzyka cytogenetycznego w ostrej białaczce szpikowej. Ponadto, obserwowano różnice dotyczące średniej liczby struktur SD (mała kropka) AgNOR między chorymi na ALL-B i ALL-T.

W trzeciej publikacji, której celem była ocena prognostycznego znaczenia oceny AgNOR, w grupie 24 chorych na AML, stwierdzono jedynie wyższy średni stosunek

powierzchni AgNOR do powierzchni jądra u chorych, którzy uzyskali CR po leczeniu indukującym. Nie wykazano istotnych zależności między wynikami leczenia a innymi ocenianymi parametrami. Analiza struktur i konfiguracji AgNOR w komórkach białaczkowych nie pozwala zatem określić wskaźników predykcyjnych w odniesieniu do uzyskania remisji choroby – co warto byłoby zweryfikować przeprowadzając badania na większej grupie pacjentów.

Zakończenie rozprawy stanowią trzy wnioski, wynikające bezpośrednio z przeprowadzonych badań, które stanowią próbę odpowiedzi na pytania zawarte w celu pracy, podsumowanie przeprowadzonych analiz i wytyczenia kierunku dalszych badań.

Podsumowując, uważam, że przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska lek. Małgorzaty Gajewskiej pt. „Zastosowane oceny stref organizatorów jąderkotwórczych (AgNOR ang. *argyrophilic nucleolar organizer region*) w ostrych białaczkach” spełnia warunki określone w art. 190 ust. 2 Ustawy z dnia 20 lipca 2018r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2032 poz. 742 z późn. zm). We wszystkich trzech publikacjach lek. Małgorzata Gajewska jest pierwszym autorem dwie zostały opublikowane w czasopismach z IF, łączny IF publikacji wynosi 5,626, punktacja MNiSW – 160.

Badania wykonane w ramach pracy doktorskiej przyniosły cenne obserwacje, istotne dla poznania biologii ostrych białaczki. Doktorantka wykazała się zarówno wiedzą teoretyczną jak również umiejętnością przeprowadzenia prac badawczych i wnikliwej analizy ich wyników. Z uwagi na powyższe mam zaszczyt i przyjemność przedłożyć Radzie Naukowej Wojskowego Instytutu Medycznego wniosek o dopuszczenie lek. Małgorzaty Gajewskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Warszawa 03.02.2015

Janusz Ił