

**KLINIKA ONKOLOGII I HEMATOLOGII DZIECIĘCEJ**  
UNIWERSYTECKI DZIECIĘCY SZPITAL KLINICZNY

*im. L. Zamenhofa w Białymstoku*

**KIEROWNIK KLINIKI: PROF. ZW. DR. HAB. N. MED. MARYNA KRAWCZUK-RYBAK**

15-274 BIAŁYSTOK UL. WASZYNGTONA 17 e:mail [onkdziec@umb.edu.pl](mailto:onkdziec@umb.edu.pl) tel/fax (085) 7450846

**Ocena rozprawy na stopień doktora nauk medycznych**

**lek med. Dominiki Kulej**

**pt: „ Przebieg kliniczny a wyjściowy status białek oporności wielolekowej w leczeniu ostrej białaczki limfoblastycznej u dzieci”**

Białaczki, a wśród nich – ostra białaczka limfoblastyczna, są najczęstszym nowotworem w wieku rozwojowym. Aczkolwiek w minionym 40-leciu nastąpił ogromny postęp w leczeniu chorób nowotworowych, w tym białaczek u dzieci, to jednak u części pacjentów nie udaje się uzyskać remisji choroby lub remisja jest nietrwała. Powoduje to ciągłe poszukiwanie przyczyn tych zjawisk, a także nowych bardziej skutecznych i jednocześnie mniej toksycznych metod leczenia. Dlatego z dużym zainteresowaniem zapoznałam się z pracą doktorską lek. Dominiki Kulej jako próby wyjaśnienia przyczyny niedostatecznej skuteczności terapii przeciwnowotworowej u części pacjentów.

Przedstawiona do recenzji praca doktorska ma typowy układ, zawarta jest na 186 stronach. We wstępie Autorka omawia epidemiologię, przyczyny chorób nowotworowych wieku rozwojowego, skupiając uwagę na białaczkach, zwłaszcza ostrej białaczce limfoblastycznej. Opisuje objawy i przebieg kliniczny, analizuje nieprawidłowości w badaniach laboratoryjnych – hematologicznych, badania szpiku kostnego, zaburzenia cytogenetyczne, a także przedstawia zasady terapii przeciwnowotworowej, wskazania i rodzaje transplantacji komórek macierzystych. Ten fragment wstępu uważam za zbyt obszerny i proponowałabym ograniczenie zawartych w nim wiadomości do niezbędnych – ułatwiających zrozumienie kolejnej części dotyczącej tematu pracy doktorskiej, tj. białek oporności wielolekowej. Autorka opisuje mechanizmy oporności wielolekowej, rolę poszczególnych białek uczestniczących w tym

zjawisku, a także możliwe mechanizmy przełamania tego procesu. Przedstawione informacje w tej części wstępu są nowoczesne, opisane w zrozumiały sposób i oparte na najnowszym piśmiennictwie.

Cel, jaki postawiła sobie Autorka, dotyczy oceny ekspresji białek oporności wielolekowej : MDR-1, MDR-3, LRP, MRP-1, BCRP u dzieci z ostrą białaczką limfoblastyczną w czasie rozpoznania choroby i w 15. dobie terapii w zależności od objawów klinicznych i początkowych wyników badań laboratoryjnych, czynników prognostycznych, kwalifikacji do grup ryzyka i przewidywanej skuteczności leczenia. Ponadto Autorka stosując dwie metody diagnostyczne (RT-PCR i cytofluorometrii przepływową) postanowiła porównać ich przydatność.

Do badań zakwalifikowała 25 dzieci z ostrą białaczką limfoblastyczną leczonych w Klinice Transplantacji Szpiku, Onkologii i Hematologii Dziecięcej we Wrocławiu w latach 2006- 2013. Grupę kontrolną stanowiło 15 zdrowych dzieci. W rozdziale charakteryzującym grupę badaną (str.61-62) opisuje częstość występowania w niej poszczególnych nieprawidłowości hematologicznych odwołując się do wyników przedstawionych we wstępie, w tabeli 3, rozdziału 1.3.1- jednakże w jej grupie badanej dane te nie w pełni odpowiadają danym z w/w tabeli.

Analiza laboratoryjna przeprowadzona została w Laboratorium Glikobiologii i Oddziaływań Międzykomórkowych IITD PAN we Wrocławiu. Autorka dla swoich badań wykorzystwała reakcję RT-PCR oraz cytofluorometrii przepływową. W sposób dokładny opisała przygotowanie, izolację kwasów nukleinowych, zasady i przebieg poszczególnych etapów reakcji, co świadczy o jej znajomości metodyki i znaczącym udziale w części laboratoryjnej.

Wyniki badań przedstawione zostały w bardzo dokładny sposób, poparte odpowiednimi rycinami tabelami, co ułatwia ich analizę. Autorka uwzględniła zależność pomiędzy obecnością lub brakiem ekspresji poszczególnych białek oporności wielolekowej a występowaniem poszczególnych objawów klinicznych oraz na współzależność od parametrów hematologicznych. Autorka zasadniczo nie zaobserwowała różnic w ekspresji białek oporności wielolekowej u pacjentów demonstrujących lub nie objawy kliniczne takie jak hepato- , splenomegalia, limfadenopatia, zajęcie ośrodkowego układu nerwowego,

a także korelacji pomiędzy wskaźnikami hematologicznymi. Autorka opisuje na stronie 89 „znamiennie statystycznie lub bliskie istotności różnice w grupie pacjentów z wysoką blastozą we krwi obwodowej: Białka MRP-1 oraz BCRP w 1. dniu leczenia były obecne u 11 dzieci...”, jednakże wartości przedstawione w tabeli 26, w tym różnice znamienne statystycznie, nie są zgodne z tym opisem- znamienność istotna statystycznie  $p=0,0411$  dotyczy tylko ekspresji BCRP w dniu 15.

W dalszej części opisu wyników badań Autorka analizuje zależność pomiędzy obecnością poszczególnych białek oporności wielolekowej a wyjściowymi wartościami morfologicznymi krwi obwodowej, odsetkiem limfoblastów w szpiku, a także wpływu dotychczas uznanych czynników prognostycznych (wiek, płeć, immunofenotyp nieprawidłowości cytogenetyczne, koekspresja antygenów mieloidalnych). Analizując w/w wskaźniki stwierdza, iż nie posiadają one istotnego wpływu na 5-letnie przeżycie całkowite (OS) i 5-letnie przeżycie wolne od zdarzeń (EFS). Natomiast z wcześniejszego opisu grupy badanej nie wynika, aby Autorka prowadziła wieloletnią obserwację przebiegu klinicznego choroby. Dlatego proponuję w opisie grupy pacjentów uzupełnić informację o prowadzenie analizy prospektywnej. Istotną informacją jest obecność u dzieci posiadających rearanżację MLL równocześnie dodatniej ekspresji białek MDR-1, MRP-1 i LRP.

W kolejnym etapie Autorka oceniła wpływ ekspresji białek oporności wielolekowej na odpowiedź na steroidy oraz ocenę remisji w 15. i 33. dobie. Wykazała związek pomiędzy brakiem remisji w 33.dobie a niekorzystnym rokowaniem, niższym całkowitym przeżyciem i całkowitym przeżyciem wolnym od zdarzeń. Natomiast nie stwierdziła zależności pomiędzy ekspresją białek oporności wielolekowej a odpowiedzią na leczenie. Autorka omówiła ponadto 8 przypadków wznów i niekorzystnego przebiegu choroby. Wykazała w nich wysoką ekspresję białek oporności wielolekowej, w tym, w kilku przypadkach, pojawienie się w 15. dobie, a nieobecnej wcześniej, ekspresji poszczególnych białek oporności wielolekowej. Jest to bardzo istotne spostrzeżenie, w przypadku większej grupy badanej, stanowiło by prawdopodobnie ważny wniosek pracy.

Autorka porównując zastosowane dwie techniki badawcze wykazała znacząco częstsze występowanie ekspresji białek oporności wielolekowej przy

zastosowaniu techniki RT-PCR (62,5%) w porównaniu do cytometrii przepływowej (16,4%). Stwierdziła zależność w ekspresji białej MDR pomiędzy 1. a 15. dniem w trakcie leczenia dla białek MRP-1, LRP i BCRP. Nie zaobserwowała natomiast wpływu tych zmian na wyniki leczenia, tj. OS i EFS.

Dyskusja została przeprowadzona w sposób dojrzały i wskazuje na doskonałą znajomość problemu, doświadczenie i umiejętność posługiwania się piśmiennictwem. Autorka analizuje kolejno uzyskane wyniki i odnosi je do rezultatów uzyskanych przez innych autorów. Jak wskazuje, są one często rozbieżne, co jest też dowodem na konieczność kontynuowania badań w tym kierunku. Autorka sama zauważa, iż niewielka liczebnie grupa badana może być zasadniczą trudnością w uzyskaniu istotnych statystycznie różnic pomiędzy grupami. W swojej analizie posłużyła się 139 pozycjami piśmiennictwa, głównie anglojęzycznego.

Praca zakończona jest 14 wnioskami. Proponowałabym ich ograniczenie łącząc wnioski dotyczące wpływu białek MDR na parametry kliniczne (wniosek 2,3,5,6 oraz wniosek 4 i 7) i przebieg kliniczny choroby (wniosek 8 i 9 oraz wniosek 10 i 11). Jak wielokrotnie podkreśla Autorka i co również stanowi jeden z wniosków – konieczna jest kontynuacja badań na większej liczebnie grupie pacjentów, w tym prowadzenie badań wieloletnich. Wniosek 3. wymaga ponadto przerehabilitacji.

W podsumowaniu stwierdzam, iż praca doktorska lek. Dominiki Kulej spełnia ustawowe warunki stawiane rozprawom doktorskim; dotyczy bardzo istotnego problemu badawczego, została wykonana rzetelnie, w oparciu o nowoczesne techniki diagnostyczne, z dobrą dokumentacją i jej opisem. Świadczy dużym zaangażowaniu i o dojrzałości naukowej Doktorantki.

Zwracam się do Wysokiej Rady Wydziału Lekarskiego Kształcenia Podyplomowego Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu o dopuszczenie lek. med. Dominiki Kulej do kolejnych etapów przewodu doktorskiego.

Krawczuk-Rybak  
KIEROWNIK  
Kliniki Onkologii i Hematologii Dziecięcej

prof. dr hab. med. Maryna Krawczuk-Rybak