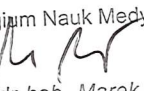




Katedra i Klinika Hematoonkologii i Transplantacji Szpiku
Uniwersytet Medyczny w Lublinie
Department of Haematooncology and Bone Marrow Transplantation
Medical University of Lublin
Kierownik: prof. dr hab. med. Marek Hus
ul. Staszica 11, 20-081 Lublin


Kanclerz
Kolegium Nauk Medycznych

Prof. dr hab. Marek Ruchała

Lublin, 18.11. 2023 r.

Prof. dr hab. n. med. Marek Hus
Uniwersytet Medyczny w Lublinie
Klinika Hematoonkologii i Transplantacji Szpiku

Ocena rozprawy doktorskiej **mgr Zuzanny Kanduła** pt. „Wybrane warianty genetyczne a manifestacja laboratoryjna zdefiniowanych molekularnie nowotworów mieloproliferacyjnych Filadelfia ujemnych” - wykonanej pod kierunkiem prof. dr hab. n. med. Krzysztofa Lewandowskiego.

Hematopoetyczne pluripotencjalne komórki macierzyste mają zdolność do samoodnowy i dają początek linii szpikowej lub limfoidalnej, które dalej różnicują się w różne dojrzałe komórki krwi, takie jak czerwone krwinki (RBC), limfocyty, granulocyty, megakariocyty i makrofagi. Proces krwiotwórczy jest determinowany przez środowisko szpiku kostnego, czynniki wzrostu i czynniki transkrypcyjne. Nieprawidłowa proliferacja jednej lub więcej końcowych linii komórek mieloidalnych prowadzi do powstania heterogennej grupy zaburzeń zwanych mieloproliferacjami. W 1951 roku William Dameshek wprowadził termin "zespoły mieloproliferacyjne", który obecnie został zmieniony przez Światową Organizację Zdrowia na "nowotwory mieloproliferacyjne" (MPN). Przewlekła białaczka szpikowa (CML), czerwienica prawdziwa (PV), małopłytkowość samoistna (ET) i pierwotne włóknienie szpiku (PMF) to cztery klasyczne typy nowotworów mieloproliferacyjnych. Klasyfikacja WHO




obejmuje również przewlekłą białaczkę neutrofilową (CNL), przewlekłą białaczkę eozynofilową (CEL), mastocytozę systemową (SM) i MPN niesklasyfikowane. Spośród klasycznych typów MPN, CML jest BCR-ABL1 dodatnia, ale PV, ET i PMF są BCR-ABL1 ujemne. Poza tym, piąta edycja klasyfikacji WHO dla ostrych białaczek i nowotworów mieloproliferacyjnych została zrewidowana w 2022 roku ze względu na ostatnie postępy w diagnostyce chorób hematologicznych z identyfikacją markerów molekularnych dając lepsze zrozumienie patogenezы molekularnej i genetyki nowotworów krwi.

W ciągu ostatnich trzech dekad zapadalność na nowotwory hematologiczne wzrosła dwukrotnie. Aktualnie w Polsce choruje ok. 150 000 osób, a każdego roku diagnozowanych jest 6 000 nowych przypadków. Do niedawna uważano, że nowotwory hematologiczne występowały u osób starszych, po 60 roku życia; ale coraz częściej chorują osoby młodsze w wieku 20-40 lat, a nawet dzieci.

Od kilku lat obserwujemy pozytywne zmiany w dostępie polskich pacjentów hematologicznych do optymalnych terapii. Wprowadzono wiele leków celowanych, ukierunkowanych na komórki nowotworowe albo angażujących układ immunologiczny do skutecznej walki z chorobą. Nowe leki pozwoliły na skuteczniejszą kontrolę chorób hematologicznych, które coraz częściej zyskują miano chorób przewlekłych.

Szeroki wachlarz dostępnych terapii z jednej strony stanowi wyzwanie dla systemu ochrony zdrowia, z drugiej rodzi wiele dylematów klinicznych jak najlepiej dobrać odpowiedni lek dla konkretnego chorego. Istnieje niewątpliwa konieczność rozwoju terapii personalizowanej oraz poszukiwanie czynników ryzyka niekorzystnego przebiegu nowotworów hematologicznych.

Rozprawa doktorska mgr Zuzanny Kanduła oparta jest na wynikach badań, spójnego tematycznie zbioru pięciu oryginalnych prac opublikowanych w recenzowanych czasopismach naukowych. Celem pracy była ocena wpływu profilu molekularnego i zmian w morfologii krwi w grupie 395 chorych z rozpoznaniem osteomielfibrozy, nadpłytkowości samoistnej i czerwienicy prawdziwej. Rozprawę otwiera artykuł pt. Calreticulin- a multifaced protein. – opublikowany w 2021 roku w czasopiśmie Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej (IF-0,357). Jest to praca poglądowa, która prezentuje aktualny stan wiedzy na temat roli i funkcji kalretikuliny. Autorka dokładnie omawia strukturę, proces regulacji transkrypcji genu kalretikuliny, opisuje role wariantów




kalretikuliny w procesie transformacji nowotworowej oraz potencjalne znaczenia patogennych wariantów tego białka w immunoterapii nowotworów.

Kolejna publikacja pt. „RAPID progression of myelofibrosis in polycythemia vera patient carrying SRSF2 c.284C>A p.(Pro95His) and unique ASXL1 splice site c.1720-2A>G variant” z Journal of Clinical Laboratory Analysis 2022 (IF-2,700) jest opisem przypadku pacjentki z czerwienicą prawdziwą o agresywnym przebiegu klinicznym z szybką progresją do fazy fibrotycznej, prawdopodobnie związanym z współwystępowaniem wariantów sekwencji genów ASXL1 oraz SRSF2. Jak sugeruje Autorka, opublikowany przypadek potwierdza znaczenie wariantu SRSF2 jako istotnego czynnika ryzyka w czerwienicy prawdziwej i jednocześnie wskazuje na konieczność szczegółowej oceny molekularnej chorych na PV celem oceny sygnatury ryzyka ciężkiego przebiegu tej choroby.

Trzecią pracą cyklu jest artykuł pt. „JAK2V617F variant allele frequency, non-driver mutations, single-nucleotide variants and polycythemia vera outcome” opublikowany w Journal of Cancer Research and Clinical Oncology w 2022 roku. (IF 3,600). W pracy Doktorantka ocenia związek pomiędzy charakterystyką laboratoryjną i molekularną czerwienicy prawdziwej a potencjalnym ryzykiem powikłań zakrzepowych, procesem transformacji blastycznej, procesu włóknienia oraz potencjalnego ryzyka zgonu. Ciekawa analiza oraz bardzo interesujące wnioski końcowe w opinii recenzenta pozycjonują wartość kliniczną tej publikacji bardzo wysoko. Autorka, u chorych z czerwienicą prawdziwą wskazuje na bezpośredni związek między obciążeniem allelem wariantowym JAK2V617F, haplotypu 46/1 a procesem transformacji do fazy fibrotycznej oraz czasem całkowitego przeżycia i ryzykiem szybkiego zgonu.

Czwarta publikacja dysertacji nosi tytuł „Essential thrombocythaemia progression to the fibrotic phase is associated with a decrease in JAK2 and PDL1 levels” opublikowana została w 2022 roku w Annals of Hematology (IF-3,500).

Celem badań była ocena ekspresji mRNA PDL1 i JAK2 oraz próba odpowiedzi na pytanie - czy ekspresja mRNA PDL1 i JAK2 ma związek z obrazem klinicznym i czasem progresji do fazy zwłóknienia u chorych z nadpłytkowością samoistną. Na podstawie przeprowadzonych doświadczeń Autorka wykazała, że całkowity poziom mRNA PDL1 i JAK2 u chorych z nadpłytkowością spada wraz ze wzrostem stopnia zwłóknienia w szpiku kostnym w procesie transformacji do wtórnej osteomielifibrozy.



Cykl prac zamyka publikacja pt. „High molecular risk variants, severe thrombocytopenia and large unstained cells” opublikowana 2023 r. w czasopiśmie Journal of Applied Genetics (IF-2,400). Przedmiotem badań w ostatniej pracy było zbadanie wpływu obecności określonych zmian laboratoryjnych i molekularnych z uwzględnieniem wariantów wysokiego ryzyka osteomielfibrozy na jej przebieg kliniczny, niestabilność molekularną z oceną całkowitego przeżycia i ryzyka zgonu. Praca zawiera istotną konkluzję, potwierdzającą znaczenie wariantów wysokiego ryzyka choroby, obecnej małopłytkowości w chwili rozpoznania oraz bezwzględnej liczby tzw. dużych niebarwiących się komórek LUC we krwi obwodowej na zwiększone ryzyko progresji do fazy akceleracji, fazy blastycznej oraz ryzyka zgonu u chorych z osteomielfibrozą.

Wszystkie prezentowane prace są bardzo interesujące oraz posiadają istotne walory poznawcze. Dostarczają wielu nowych, wartościowych obserwacji klinicznych dotyczących stratyfikacji chorych z rozpoznaniem nowotworów mieloproliferacyjnych Ph ujemnych. Odnoszą się do niestabilności genetycznej komórek macierzystych, z definiowaniem czynników predysponujących do ich powstawania oraz opisują podłoże molekularne, które ma bezpośredni wpływ na niepomyślny, agresywny ich przebieg. Jest to zbiór inspirujących nowych odkryć w molekularnym i epigenetycznym krajobrazie procesów transformacji oraz nowotworzenia, bezpośrednio powiązanych ze zmieniającym się obrazem klinicznym nowotworów Ph (-). Publikacje naukowe mgr Zuzanny Kandyły są fragmentem dużego projektu naukowego, którego od wielu lat głównym pomysłodawcą i architektem jest promotor recenzowanej pracy doktorskiej Profesor Krzysztof Lewandowski. Dzięki wieloletniej współpracy Kliniki Hematologii UM w Poznaniu oraz osobistym kontaktom naukowym profesora Lewandowskiego z wieloma ośrodkami naukowymi w Polsce, zebrano unikalne w skali międzynarodowej dane od ponad 390 pacjentów chorych na nowotwory mieloproliferacyjne Ph ujemne. Ze swej strony dodam, iż w dobie terapii opartych na lekach celowanych z grupy min. inhibitorów kinaz janusowych opublikowane przez Doktorantkę obserwacje mogą mieć kardynalne znaczenie terapeutyczne w niedalekiej przyszłości.

W tym kontekście wybór tematu rozprawy doktorskiej mgr Zuzanny Kandyły uznaję za aktualny i uzasadniony naukowo.




Wstęp rozprawy jest bardzo szczegółowym i obszernym opisem aktualnej wiedzy, obejmującym epidemiologię oraz obraz kliniczny nowotworów mieloproliferacyjnych Ph ujemnych. Autorka w interesujący sposób omawia ich podłoże molekularne oraz opisuje predyspozycje genetyczne do wystąpienia określonych postaci nowotworów mieloproliferacyjnych. Wymienia poznane warianty germinalne genów odpowiedzialnych za poznane wzory somatycznych wariantów genowych w komórkach macierzystych, predysponujących do transformacji nowotworowej. Doktorantka wyczerpująco opisuje znaczenie ścieżki sygnałowej JAK/STAT, najważniejszego szlaku regulującego hematopoezę, proliferację dojrzewania, różnicowanie i procesy apoptyczne szeregu mieloidalnego. Szczegółowo opisuje poznane warianty mutacji „kanonicznych” napędzające nowotwór oraz poznane warianty molekularne, które im towarzyszą. W rozdziale tym dość szczegółowo opisane zostały molekularne czynniki ryzyka oraz nowoczesne techniki ich wykrywania. Umiejętność wiązania informacji z różnych dziedzin biologii z obserwacjami klinicznymi jest cennym atrybutem wskazującym na szeroką wiedzę z odpowiednim łączeniem faktów przez Doktorantkę. **Uważam, że wstęp rozprawy wyczerpująco wprowadza w problematykę podjętą w badaniach.**

W celu pracy Autorka prezentuje poprawnie formułowane hipotezy badawcze, wyróżniając cztery problemy badawcze, których rozwiązanie pozwoli w założeniu Autorki, uzyskać precyzyjną odpowiedź na postawione założenia i tezy rozprawy doktorskiej.

Postawiony cel pracy obejmuje zróżnicowane, lecz spójne zagadnienia. Wskazuje to na dobre, wielopłaszczyznowe zorientowanie Doktorantki w zakresie zaplanowanych badań i jest odpowiednim punktem wyjścia do przeprowadzenia eksperymentów oraz zaprojektowanej analizy danych klinicznych z wynikami przeprowadzonych badań naukowych.

Postawione hipotezy badawcze są ciekawe, a ich analiza może po dalszych dogłębnych badaniach stanowić istotną wartość o charakterze klinicznym.

Materiał i metody zostały opisane z dbałością o szczegóły. Opis procedur badawczych umieszczony w opublikowanych pracach oryginalnych jest klarowny. Metodyka, na której oparto część badawczą pracy jest bardzo nowoczesna i dobrana adekwatnie do realizacji założonych celów pracy. W



rozdziale tym, Autorka umieściła zestawienie badań wykonywanych w trakcie realizacji statystycznej analizy poszczególnych eksperymentów.


Wnioski oparte są w pełni na uzyskanych wynikach wskazując, które z nich stanowią najistotniejsze osiągnięcia pracy badawczej składającej się na rozprawę doktorską. Wykonane podsumowanie jest zwięzłe zawierające ogólne spostrzeżenia jak również sugestie Autorki dotyczące potencjalnej możliwości praktycznego wykorzystania uzyskanych wyników w diagnostyce i terapii chorych z rozpoznaniem nowotworów mieloproliferacyjnych Ph ujemnych.

Dyskusja stanowi bardzo obszerny fragment ocenianej rozprawy i została przeprowadzona w opublikowanych pracach w sposób rzeczowy, zarówno w oparciu o własną wiedzę jak i informacje pochodzące z najnowszej światowej literatury, co świadczy o dojrzałości badawczej Doktorantki oraz wysoce merytorycznej opiece Promotora. Całość badań z odnosząca się do nich dyskusją zebrana jest w pięciu opublikowanych pracach naukowych, o istotnym współczynniku wpływu (IF-12,557- dla całości zaprezentowanych prac).

W mojej ocenie Doktorantka w sposób przemyślany łączy fakty i konsekwentnie stara się interpretować uzyskane wyniki mając na uwadze postawione hipotezy badawcze. Na uwagę zasługuje wykonana przez Autorkę interpretacja uzyskanych wyników, ich trafne wytłumaczenie oraz przeprowadzenie nieschematycznych podsumowań.

Recenzowana rozprawa zawiera **streszczenie** w języku polskim i angielskim. Rozdział ten obejmuje niezbędną charakterystykę dotyczącą założeń badawczych podejmowanych w pracy, uzyskanych wyników oraz ich interpretacji w odniesieniu do uwarunkowań klinicznych. Rozdział, choć umieszczony na końcu dysertacji, umożliwia szybkie zorientowanie się w zakresie pracy badawczej oraz celowości podjęcia opisanych i opublikowanych badań

Podsumowując, stwierdzam, że Doktorantka w pełni wypełniła zadania, jakie zostały postawione w celu pracy. Istotnym osiągnięciem ocenianej dysertacji jest również umiejętność wykazania się przez Autorkę naukową pokora, wobec różnorodności obserwowanych zdarzeń klinicznych, konfrontowanych z dobrą praktyką medyczną. Poprzez swą nietypowość nie mogą one być objęte analizą



statystyczną a wymagają równie nietypowych, indywidualnych decyzji klinicznych w odniesieniu do trudnej diagnostyki molekularnej i terapii nowotworów mieloproliferacyjnych.

Doktorantka wykazała bardzo dobre zorientowanie w aktualnych doniesieniach literatury światowej dotyczącej zaplanowanych badań. Interpretacja wyników jest odpowiednia jak również na uznanie zasługuje umiejętność powściągliwego i odpowiedzialnego wyprowadzenia wniosków. Wartość pracy i uzyskanych wyników badań Doktorantki, potwierdzona została akceptacją międzynarodowego środowiska naukowego oraz ich publikacją w renomowanych czasopismach o wysokim współczynniku wpływu.

Rozprawa doktorska mgr Zuzanny Kanduła jest opracowaniem spełniającym wszystkie warunki wymagane odpowiednią ustawą - art.13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki. (Dz.U.2016, poz. 882 z późn.zm.) - dla dysertacji doktorskich. Praca ma charakter poznawczy i niewątpliwie posiada niezwykle ciekawe implikacje kliniczne. Stanowi również podstawę do dalszych badań laboratoryjnych i klinicznych.

W mojej ocenie zasługuje na **wyróżnienie** z uwagi na wyjątkowo wysoki poziom naukowy. Z całą pewnością jest jedną z najlepszych ocenianych dotychczas przeze mnie dysertacji doktorskich. Ogólny dorobek naukowy z uwzględnieniem ocenianej pracy stanowi znakomitą podstawę kolejnego bardzo szybkiego awansu naukowego Autorki.

Mam zaszczyt przedstawić Kapitulę Kolegium Nauk Medycznych Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu **wysoce pozytywną recenzję** i wnoszę o dopuszczenie mgr. Zuzanny Kanduły do dalszych etapów przewodu doktorskiego.


KIEROWNIK
Katedry i Kliniki Hematoonkologii
i Transplantacji Szpiku
Prof. dr hab. n. med. Marek Hus