

Gdańsk, 30 sierpnia 2023 r.

dr hab. n. med. Joanna Stefanowicz  
Katedra i Klinika Pediatrii, Hematologii i Onkologii  
Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

## RECENZJA

pracy doktorskiej lek. Magdaleny Kamińskiej

pt. "*Bezwzględna liczba limfocytów i inne wskaźniki odnowy jako czynniki prognostyczne w ostrych białaczkach u dzieci*"

Białaczka jest najczęstszą chorobą nowotworową wieku dziecięcego. Obecnie dokładna stratyfikacja pacjentów do poszczególnych grup ryzyka oparta jest o określone czynniki rokownicze, wśród których istotną rolę odgrywają badania immunofenotypu i rearanżacji genetycznych stwierdzanych w komórkach białaczkowych oraz ocena choroby resztkowej w poszczególnych punktach czasowych. Mimo to u około 15-20% pacjentów dochodzi do wznowy.

Znajomość czynników prognostycznych umożliwia dokładną stratyfikację chorego, pozwala na wybór właściwej grupy terapeutycznej i zastosowanie odpowiedniej terapii, zatem umożliwia wyodrębnienie grup pacjentów, którzy wymagają intensyfikacji leczenia, a jednocześnie w grupach chorych o lepszej prognozie pozwala na mniej intensywną terapię, a zatem ograniczenie występowania toksyczności narządowych i odległych powikłań.

Dlatego też poszukiwanie nowych czynników prognostycznych i ustalanie ich roli w terapii ostrych białacek u dzieci oraz podjęcie badań w tym zakresie uważam za zasadne i ważne. Lek. Magdalena Kamińska podjęła próbę ustalenia czy jednym z czynników prognostycznych w ALL może być bezwzględna liczba limfocytów (ALC- *Absolute Lymphocyte Count*) w końcowym etapie terapii indukcyjnej, zwłaszcza, że w ostatnim czasie wskazuje się na jej związek z całkowitym przeżyciem (OS – *Overall Survival*) oraz z przeżyciem wolnym od zdarzeń (EFS – *Event Free Survival*).

Praca ma typowy dla rozpraw doktorskich układ, liczy 109 stron maszynopisu, zilustrowana jest 13 rycinami i zawiera 15 tabel. Składa się z 8 rozdziałów, w tym wykazu skrótów używanych w tekście, oraz ze streszczeń w języku polskim i angielskim, wykazu rycin i tabel oraz spisu 81 starannie dobranych pozycji piśmiennictwa, uwzględniających aktualne doniesienia anglojęzyczne, jak i prace opublikowane w rodzimych czasopiśmie.

We „Wstępie” Autorka przedstawia kolejno ogólną charakterystykę białacek u dzieci, rokowanie, poprawę wyników leczenia białacek u dzieci na przestrzeni lat, klasyfikację



ostrych białaczek u dzieci oraz zagadnienia dotyczące zasad diagnostyki i oceny odpowiedzi na leczenie w ALL.

Następnie w podrozdziale 3.4 Autorka dokładnie omawia obecnie obowiązujące czynniki prognostyczne w ostrych białaczkach u dzieci oraz prezentuje ewolucję poglądów na temat czynników prognostycznych na przestrzeni lat (początkowo brano pod uwagę wielkość wątroby, śledziony, masy w śródpiersiu, zajęcie CUN oraz początkową liczbę blastów we krwi obwodowej, następnie badano odpowiedź na leczenie – ocena w 8. dobie liczby blastów we krwi obwodowej oraz ocena remisji w szpiku kostnym w dobie 15. (<25% blastów) i w dobie 33. (<5% blastów). Ocena odpowiedzi na profazę z prednizonem okazała się najsilniejszym czynnikiem prognostycznym. W latach 1990-1995 prowadzono badanie oceniające odpowiedź na 7. dniową terapię z prednizonem i 1 dawkę dokonałowo podanego metotreksatu. Za kryterium rokownicze przyjęto graniczna wartość 1000 blastów/ $\mu$ L we krwi obwodowej. Udowodniono, że pacjenci z mniejszą < liczbą blastów niż 1000/ $\mu$ L we krwi obwodowej mieli zdecydowanie lepsze przeżycie wolne od zdarzeń (EFS) w porównaniu z grupą, która miała >liczbę niż 1000 blastów we krwi obwodowej po 7. dniowej terapii prednizonem. Kolejnym odkrytym czynnikiem rokowniczym pozostały aberracje chromosomowe związane ze znacznie gorszym rokowaniem – translokacja 9;22 – obecność genu fuzyjnego BCR-ABL, translokacja 4;11 – obecność genu fuzyjnego MLL-AF4, obecność hipodiploidii. W oparciu o wielośrodkowe badania ustalono, że istotnymi czynnikami rokowniczymi są wiek (dzieci < 1 roku życia i > 6 lat mają gorsze rokowanie) oraz liczba leukocytów w momencie diagnozy (>20 000/l gorsze rokowanie). Obecnie ocena minimalnej choroby resztkowej na wczesnym etapie leczenia uważana jest za najważniejszy czynnik rokowniczy.

Następnie Autorka dokładnie omawia czynniki ryzyka badane w ramach protokołów ALL-BFM w latach 1981-86, ALL-BFM-90, ALL-BFM-95, ALLIC BFM 2002 i 2009.

W dalszej kolejności Autorka szeroko omawia różne protokoły terapii ALL u dzieci stosowane w takich krajach jak: Włochy, Japonia, Stany Zjednoczone oraz Polska.

Szczególnie interesujące jest omówienie nowych czynników ryzyka jakimi są translokacje chromosomowe o znaczeniu prognostycznym. Zwłaszcza, że geny fuzyjne mają nie tylko znaczenie stratyfikacyjne, stanowią również punkty uchwytu leczenia celowanego.

Podsumowując w rozdziale „Wstęp” adekwatnie i obszernie opisano rolę poznanych już czynników prognostycznych w leczeniu ALL u dzieci, zaprezentowano podejście do stratyfikacji pacjentów z ALL w międzynarodowych badaniach klinicznych oraz przedstawiono wyniki ww. badań.

Autorka w ten sposób uzasadnia potrzebę prowadzenia dalszych badań w tym zakresie. Rozdział ten jest przemyślany i świadczy o dużej wiedzy Doktoranta na ten temat i umiejętności spojrzenia na zagadnienie przez pryzmat poszukiwania nowych rozwiązań.

Następnie w rozdziale 4 Autorka omawia założenia pracy i precyzuje jej cel.

Lek. Magdalena Kamińska postawiła sobie następujące cele pracy: odpowiedź na pytanie czy ALC w trakcie terapii indukcyjnej jest wskaźnikiem prognostycznym mającym wpływ na OS i EFS u dzieci z ALL oraz ocena odnowy hematopoetycznej (wyrażonej poprzez następujące wskaźniki ALC, AMC – Absolute Monocyte Count, APC – Absolute Platelet Count), po indukcji



remisji u dzieci, u których rozpoznano ALL leczonych zgodnie z programami ALL IC-BFM 2002 i 2009, ocena związku odnowy hematopetycznej z uznanymi czynnikami prognostycznymi ALL, takimi jak: rodzaj białaczki, grupa ryzyka, wiek dziecka przy rozpoznaniu, leukocytoza wstępna, stan zajęcia Ośrodkowego Układu Nerwowego, ocena odpowiedzi na leczenie, minimalna choroba resztkowa (MRD-Minimal Residual Disease), aktywność dehydrogenazy mleczanowej LDH, parametry kliniczne (obecność hepato- i splenomegalii), ocena wpływu ww. czynników na OS i EFS.

W rozdziale „Pacjenci i metody” Autorka przedstawia grupę badaną, którą stanowiło 151 dzieci z rozpoznaniem ALL leczonych w Klinice Onkologii i Hematologii Dziecięcej w Białymstoku w latach 2002-2017. Dokonano retrospektywnej analizy dokumentacji pacjentów. Badanie przeprowadzono po uzyskaniu zgody właściwej komisji bioetycznej.

U wszystkich pacjentów oceniono parametry morfotyczne krwi oraz parametry biochemiczne w dniu rozpoznania oraz w dobie 8, 15 i 33 terapii indukcyjnej. Analizowano także rodzaj białaczki, grupę ryzyka, stan zajęcia OUN, odpowiedź na leczenie, ocenę MRD, parametry biochemiczne i kliniczne.

W rozdziale 5.4 przedstawiono użyte do analizy uzyskanych wyników badań metody statystyczne.

ALC oceniono jako zmienną ciągłą oraz skategoryzowaną i na cele analizy statystycznej pacjentów podzielono na 2 grupy w oparciu o wartość ALC (Absolute Lymphocyte Count – bezwzględna liczba limfocytów) w dobie 33, za *cut-off* ALC przyjęto wartość 750 komórek/mikroL (mediana ALC w dobie 33). Analizie statystycznej poddano również takie parametry jak: AMC (Absolute Monocyte Count – bezwzględna liczba monocytów), APC (Absolute Platelet Count – bezwzględna liczba płytek), stężenie Hgb i WBC (White Blood Count – bezwzględna liczba krwinek białych).

W rozdziale tym nie dostrzegłam informacji na temat testu statystycznego użytego do przeprowadzenia analizy wieloczynnikowej.

Wyniki badania zostały przedstawione w jasny i czytelny sposób. Materiał ilustracyjny i tabele ułatwiające ich śledzenie, zostały przygotowane bardzo starannie.

W rozdziale „Wyniki” mimo stosunkowo krótkiego okresu FU (średni 4 lata i 9 miesięcy) Doktorantka stwierdziła, że w modelu AFT dla przeżycia zbudowanym w oparciu o predyktory ciągle obserwowano istotną zależność między bezwzględną liczbą limfocytów oraz liczbą płytek w 33 dobie leczenia ALL a czasem przeżycia ( $p=0.03$ ,  $p=0.01$ ). Takich zależności nie obserwowano w stosunku do liczby leukocytów i stężenia hemoglobiny w 33 dobie.

W przypadku modeli wieloczynnikowych, zbudowanych z jednoczesnym uwzględnieniem ALC oraz innego ze współliniowych predyktorów (WBC, Hgb, APC), w każdym z modeli wykazano zależność między czasem do zgonu a ALC.

W modelu AFT dla przeżycia zbudowanym w oparciu o predyktory w formie zmiennych skategoryzowanych stwierdzono zależność między czasem przeżycia a ALC ( $\geq 750/\mu\text{L}$ ,  $p=0.03$ ), WBC ( $\geq 2.25 \times 10^3/\mu\text{L}$ ,  $p=0.01$ ) i APC ( $\geq 190 \times 10^3/\mu\text{L}$ ,  $p=0.03$ ).

W analizie wieloczynnikowej nie uzyskano istotności dla żadnej z analizowanych zmiennych.



Ponadto obliczono 3-letni i 5-letni EFS i OS dla całej grupy. Oceniono EFS i OS w obserwacji 3, 5, 7 i 10 letniej dla pacjentów z ALC  $\geq 750/\mu\text{L}$  oraz z ALC  $< 750/\mu\text{L}$  w 33. dobie. EFS było niższe w grupie z ALC  $< 750/\mu\text{L}$ .

Następnie Autorka sformułowała wnioski - ALC  $< 750/\mu\text{L}$  w 33 dobie wiąże się z gorszym rokowaniem i krótszym czasem przeżycia. Parametry ALC oraz APC są pozytywnymi predyktorami czasu przeżycia. Nie wykazano zależności między ALC a znanymi czynnikami ryzyka.

Na uwagę zasługuje bardzo dokładne i staranne opracowanie statystyczne wyników uwzględniające ponad standardowe metody analizy statystycznej.

„Dyskusja” napisana jest dojrzałe i sprawnie. Świadczy o dużej wiedzy Doktoranta i umiejętności przyrównywania uzyskanych rezultatów do wyników opublikowanych przez innych badaczy. Ponadto w rozdziale tym Autorka omawia ograniczenia badania, do których zalicza: liczebność całkowitą, liczebność w poszczególnych punktach czasowych, konieczność dzielenia pacjentów na grupy w zależności od określonych znanych czynników ryzyka, trudności związane z estymacją dla analizy wieloczynnikowej.

Autorka w podsumowaniu podkreśla również zalety ALC jako czynnika prognostycznego.

Wnioski dobrze korespondują z celami pracy, są prawidłowo sformułowane i w pełni odnoszą się do uzyskanych wyników.

#### Uwagi krytyczne

Tytuł pracy „Bezwzględna liczba limfocytów i inne wskaźniki odnowy jako czynniki prognostyczne w ostrych białaczkach u dzieci” nie jest precyzyjny. Ostatecznie do badania zakwalifikowano tylko dzieci z rozpoznaniem ALL leczone w latach 2002-2017.

W przyszłości w celu przygotowania pracy do publikacji proponuję sformułowanie kryteriów włączenia i wyłączenia z badania.

Tabela 5 – nagłówek rubryki 3 w sposób pełny nie odzwierciedla zawartości

Rozdział 4 obejmujący założenia i cel pracy jest szeroki. Korzystniej byłoby wydzielić wyraźnie cel pracy.

Zdanie „*Za pomocą cytometrii przepływowej określono immunofenotyp limfocytów, komórki CD3+ stanowiły medianę 73.4% jednojądrzastych komórek krwi obwodowej podczas wczesnej regeneracji limfocytów krwi obwodowej, spośród tych komórek, komórki CD8+ (limfocyty T cytotoksyczne) stanowiły medianę 16.7%, a komórki CD4+ (limfocyty Th, pomocnicze) 66.4%*” jest niejasne.

Rozdział 5.4 Metody statystyczne – nie dostrzegłam informacji na temat nazwy testu statystycznego użytego do przeprowadzenia analizy wieloczynnikowej

Ponadto praca zawiera drobne błędy literowe, interpunkcyjne, stylistyczne i gramatyczne np. rozdział 6 str. 48 – powtórzenie słowa *niezbędne*.

W ostatecznej publikacji warto byłoby poświęcić nieco więcej miejsca ograniczeniom badania dostrzeżonym w czasie opracowywania zebranych danych.

Podsumowując, oceniana praca jest oryginalnym opracowaniem naukowym. Wartość poznawcza i kliniczna przeprowadzonych badań jest wysoka.

Wymienione przeze mnie uwagi i propozycje poprawek nie zmniejszają wartości pracy, mam nadzieję, że okażą się przydatne w opracowywaniu opartej na rozprawie publikacji.

W oparciu o powyższą opinię stwierdzam, że rozprawa doktorska lek. Magdaleny Kamińskiej pt. *"Bezwzględna liczba limfocytów i inne wskaźniki odnowy jako czynniki prognostyczne w ostrych białaczkach u dzieci"* spełnia warunki określone w art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych u tytule naukowym oraz o stopniach naukowych i tytule naukowym w zakresie sztuki (Dz. U. z 2017 r., poz. 1789).

Zwracam się zatem do Senatu Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku o dopuszczenie Pani lek. Magdaleny Kamińskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie chciałam podkreślić moją bardzo pozytywną całościową ocenę pracy i docenić znaczącą sprawność Autorki w formułowaniu myśli, założeń i wniosków oraz profesjonalne podejście do analizy statystycznej zgromadzonych danych.

dr hab. n. med. Joanna Stefanowicz



