



Autoreferat

Dr n. med. Maciej Niedźwiecki

Gdański Uniwersytet Medyczny

Katedra i Klinika Pediatrii, Hematologii i Onkologii

2019

Spis treści:

1. Imię i nazwisko.....	4
2. Uzyskane tytuły naukowe i zawodowe.....	4
3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu.....	4
3.1. Zatrudnienie w hospicjum.....	4
3.2. Zatrudnienie w szpitalu klinicznym.....	5
3.3. Zatrudnienie w jednostce naukowo-badawczej.....	5
4. Wskazanie osiągnięcia naukowego.....	6
4.1. Tytuł osiągnięcia naukowego.....	6
4.2. Osiągnięcie naukowe tworzy cykl 4 powiązanych tematycznie publikacji.....	6
5. Omówienie celu naukowego ww. prac oraz uzyskanych wyników wraz z omówieniem ich potencjalnego wykorzystania.....	7
5.1. Wstęp.....	7
5.2. Opracowanie nowej metody analitycznej o potencjale diagnostycznym umożliwiające jednoczesne oznaczenie wielu amin biogennych w małych objętościach płynów ustrojowych pobranych od pacjentów pediatrycznych chorujących na ALL.	9
5.2.1. Podsumowanie, wnioski i plany na przyszłość.....	11
5.3. Poszukiwanie nowych biomarkerów w kondensatach wydychanego powietrza pobranego od dzieci z ALL przy użyciu metod chromatograficznych.....	12
5.3.1. Podsumowanie, wnioski i plany na przyszłość.....	14
5.4. Poszukiwanie nowych markerów immunologicznych we krwi obwodowej i szpiku kostnym pobranym od dzieci z ALL przy użyciu cytometrii przepływowowej.....	15
5.4.1. Podsumowanie, wnioski i plany na przyszłość.....	19
6. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych wraz z analizą bibliometryczną.....	20
6.1. Ostra białaczka limfoblastyczna (ALL) u dzieci – wybrane zagadnienia diagnostyki i terapii.....	21
6.1.1. Diagnostyka cytometryczna ostrych białaczek dziecięcych.....	21
6.1.2. Ostra białaczka limfoblastyczna (ALL) u dziecka z zespołem Downa.....	23
6.2. Chłoniaki nieziarnicze (NHL) u dzieci – wybrane zagadnienia diagnostyki, terapii oraz obserwowanych efektów ubocznych leczenia.....	24
6.3. Ostra białaczka mieloblastyczna (AML) u dzieci – wybrane zagadnienia diagnostyki i terapii.....	24
6.4. Przewlekła białaczka szpikowa (CML) - wybrane zagadnienia diagnostyki i terapii.....	25
6.5. Znaczenie przeszczepiania komórek macierzystych w schorzeniach onkohematologicznych u dzieci.....	25
6.6. Guzy lite u dzieci - wybrane zagadnienia diagnostyki, terapii oraz występujących powikłań terapeutycznych.....	26

6.7. Powikłania infekcyjne w okresie intensywnego leczenia chorób nowotworowych u dzieci.....	26
6.8. Endokrynologia i diabetologia dziecięca – zaburzenia wzrastania, wybrane aspekty diagnostyki i leczenia dzieci z cukrzycą.....	27
7. Aktualnie prowadzona współpraca naukowa z innymi zespołami badawczymi oraz planowany rozwój badań w przyszłości.....	28
7.1. Projekt 1: Kombinacje substancji biologicznie aktywnych pochodzenia roślinnego jako nowa strategia farmakoterapeutyczna w ostrych białaczkach limfoblastycznych u dzieci	28
7.2. Projekt 2: Białka szoku termicznego (HSP) w ALL u dzieci.....	29
7.3. Projekt 3: Mutacja genu TP53 w hipodiploidalnej ALL u dzieci.....	29
7.4. Projekt 4: Poszukiwanie nowych markerów biochemicznych oraz immunologicznych w ostrych białaczkach dziecięcych.....	30
7.5. Projekt 5: Pierwotne i wtórne niedobory immunologiczne oraz choroby z autoagresji.....	30
8. Działalność pozanaukowa, społeczna i organizacyjna.....	31
8.1. Działalność w zawodzie lekarza.....	31
8.2. Fundacja Pomorskie Hospicjum dla Dzieci.....	31
9. Funkcje organizacyjne i społeczne pełnione na rzecz Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego i poza nim.....	32
9.1. Działalność społeczna.....	32
9.2. Osiągnięcia sportowe.....	33
9.3. Działalność na rzecz rozwoju bazy naukowej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego.....	33
10. Bibliografia.....	33

AUTOREFERAT

1. *Imię i nazwisko;*

Maciej Niedźwiecki

2. *Uzyskane tytuły naukowe i zawodowe;*

Dyplom lekarza medycyny – Wydział Lekarski Akademii Medycznej w Gdańsku, 1995 r.

Dzienne Studia Doktoranckie Akademia Medyczna w Gdańsku – od 01.11.1998 r. do 30.04.2003 r

Doktor nauk medycznych – 2004 r.

Tytuł pracy: „Rola klasycznych czynników ryzyka ze szczególnym uwzględnieniem obrazu cytogenetycznego oraz immunofenotypu komórek nowotworowych w prognozowaniu ostatecznej odpowiedzi na leczenie ostrych białaczek dziecięcych”

Recenzenci: Prof. dr hab. n.med. Jerzy Kowalczyk; Prof. dr hab. n.med. Janusz Limon.

Specjalizacja I stopnia w dziedzinie pediatrii 23.10.2000 r.

Specjalizacja II stopnia w dziedzinie pediatrii 25.03.2005 r.

Specjalizacja w dziedzinie hematologii i onkologii dziecięcej 21.04.2010 r.

Specjalizacja w dziedzinie immunologii klinicznej - rozpoczęcie 12.11.2019 r. – w trakcie.

3. *Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu;*

3.1. Zatrudnienie w hospicjum:

- Hospicjum Pallotinum Gdańsk – od 1998 r. do 01.04.2003 r.
- Hospicjum im. Ks. Eugeniusza Dutkiewicza – od 01.04.2003 r. do 28.02.2008 r.
- Fundacja Pomorskie Hospicjum dla Dzieci – od 01.04.2008 r. - nadal.

3.2. Zatrudnienie w szpitalu klinicznym:

- Państwowy Szpital Kliniczny nr 1 w Gdańsku (I Klinika Chorób Dzieci) – 17.03.1997 r. do 01.07.2001 r.
- SPSK nr.1 Akademickie Centrum Kliniczne Akademii Medycznej w Gdańsku – 01.07.2001 r. do 09.05.2004 r.
- Uniwersyteckie Centrum Kliniczne w Gdańsku, Klinika Pediatrii, Hematologii i Onkologii - od 19.05.2009 r. - nadal.
- Z-ca Kierownika Kliniki - Oddział Szybkiej Diagnostyki z Oddziałem Dziennym: od 2014 r. - nadal.

3.3. Zatrudnienie w jednostce naukowo-badawczej:

- Akademia Medyczna w Gdańsku/ aktualnie Gdański Uniwersytet Medyczny.
- Katedra i Klinika Pediatrii, Hematologii, Onkologii i Endokrynologii/ aktualnie Katedra i Klinika Pediatrii, Hematologii i Onkologii.
 - Asystent od 01.06.2006 r. (UCK). od 10.05.2004 r. (AMG/GUMED).
 - Starszy Asystent od 01.05.2013 r. (UCK).
 - Adiunkt od 30.09.2010 r. (GUMED).

4. **Wskazanie osiągnięcia naukowego*** wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U.nr 65,poz.595 ze zm).

4.1. Tytuł osiągnięcia naukowego;

Zastosowanie nowoczesnych metod cytometrycznych i chromatograficznych w ocenie nowych markerów immunologicznych i biochemicznych prognozujących odpowiedź na zastosowane leczenie w ostrej białaczce limfoblastycznej u dzieci.

4.2. Osiągnięcie naukowe tworzy cykl 4 powiązanych tematycznie publikacji:

- I. ***Lucyna Konieczna, Anna Roszkowska, Maciej Niedźwiecki, Tomasz Bączek. Hydrophilic interaction chromatography combined with dispersive liquid-liquid microextraction as a preconcentration tool for the simultaneous determination of the panel of underivatized neurotransmitters in human urine samples. J. Chromatogr. A 2016; vol. 1431, s. 111-121. (IF:3,981; MNiSzW:40.000).***
- II. ***Lucyna Konieczna, Magdalena Pyszka, Magdalena Okońska, Maciej Niedźwiecki, Tomasz Bączek. Bioanalysis of underivatized amino acids in non-invasive exhaled breath condensate samples using liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. J. Chromatogr. A 2018; vol. 1542, s. 72-81. (IF:3,716; MNiSzW:40.000).***
- III. ***Maciej Niedźwiecki, Oskar Budziło, Maciej Zieliński, Elżbieta Adamkiewicz- Drożyńska, Lucyna Maciejka-Kembłowska, Tomasz Szczepański, Piotr Trzonkowski. CD4+CD25highCD127low/-FoxP3 + regulatory T cell subpopulations in the bone marrow and peripheral blood of children with ALL: brief report. J. Immunol. Res. 2018; vol. 2018, art. ID 1292404, s. 1-9. (IF:3,298; MNiSzW:25.000).***
- IV. ***Maciej Niedźwiecki, Oskar Budziło, Elżbieta Adamkiewicz-Drożyńska, Dorota Pawlik-Gwozdecka, Maciej Zieliński, Lucyna Maciejka-Kembłowska, Tomasz Szczepański, and Piotr Trzonkowski. CD4+CD25highCD127low/-FoxP3 + regulatory T-cell population in acute leukemias - review of the literature. J. Immunol. Res. 2019; vol. 2019, art. ID 2816498, s. 15; (IF:3,298; MNiSzW:25.000).***

Łączna wartość bibliometryczna cyklu wymienionych powyżej publikacji wynosi:

IF: 14,293; punktacja MNiSW: 130.

5. *Omówienie celu naukowego ww. prac oraz uzyskanych wyników wraz z omówieniem ich potencjalnego wykorzystania.*

5.1. *Wstęp:*

Gwałtowny rozwój medycyny w ostatnich latach spowodował znaczny wzrost odsetka dzieci wyleczonych z choroby nowotworowej. Obserwacje te dotyczą przede wszystkim pacjentów z chorobami rozrostowymi układu krwiotwórczego, a w szczególności z rozpoznaniem ostrej białaczki limfoblastycznej (ALL). Intensyfikacja leczenia w grupie wysokiego ryzyka, bądź też zastosowanie mniejszych dawek cytostatyków w grupie standardowego ryzyka i unikanie radioterapii w wybranych przypadkach powoduje wyleczenie nawet u ok. 90% dzieci z ALL. Niestety, nadal istnieje grupa pacjentów z ALL poniżej 18 r.ż., która nie osiąga trwałej remisji choroby.¹

Kolejna grupa to dzieci wyleczone z ostrej białaczki z trudnymi do zaakceptowania powikłaniami toksycznej terapii. Wśród wczesnych i późnych powikłań obserwuje się ciężkie uszkodzenie narządów wewnętrznych, okaleczenie po radykalnych zabiegach chirurgicznych oraz nowotwory wtórne. Trudno też nie pamiętać o problemach psychologicznych i psychiatrycznych towarzyszących terapii przeciw białaczkowej.

Precyzyjnie dobrane schematy lecznicze pozwalają na osiągnięcie najlepszego efektu terapeutycznego przy minimalizacji objawów ubocznych. Ich dobór opiera się o ściśle określone w trakcie procesu diagnostycznego i leczniczego czynniki ryzyka. Wśród najważniejszych wymienia się podtyp immunologiczny oraz cechy genetyczne komórek blastycznych, zaawansowanie procesu nowotworowego, a także odpowiedź na leczenie w precyzyjnie określonych punktach czasowych terapii.^{2,3}

We współczesnej onkologii i hematologii dziecięcej poszukiwanie korelacji pomiędzy nowymi, a także uznanymi wcześniej czynnikami prognostycznymi oraz ostateczną odpowiedzią na zastosowaną terapię jest nadal jednym z najbardziej aktualnych zagadnień. Przykładowo do nowych czynników prognostycznych należą wybrane aberracje genetyczne, takie jak mutacje obserwowane w białaczce Ph-like (BCR-ABL1-like ALL). Aż 80% zaburzeń genetycznych obserwowanych w tym podtypie białaczki dotyczy genów odpowiadających za różnicowanie i dojrzewanie linii B (IKZF1, PAX5, E2A, EBF1 i VPREB1), a także regulujących proliferację limfocytów B (CRLF2, CDKN2A/2B). Specyficzne dla tego podtypu białaczki są też fuzje genów PDGFRB, ABL1 oraz JAK prowadzące do aktywacji kinaz szlaków metabolicznych promujących nowotworzenie. Wiele spośród zidentyfikowanych, nadaktywnych ścieżek sygnałowych może być hamowanych za pomocą dostępnych leków ukierunkowanych molekularnie.⁴

Dlatego też kolejnym ważnym wyzwaniem jest odkrycie i wprowadzenie do aktualnie stosowanych protokołów leczniczych nowych strategii terapeutycznych obejmujących podaż leków celowanych.

Doskonałym przykładem skuteczności tych leków jest włączenie do terapii inhibitora kinazy białkowej (imatinibu) w Ph (+) ALL, które poprawiło rokowanie na tyle, że u części pacjentów można było zrezygnować z transplantacji komórek macierzystych (HSCT).⁵ Do tego momentu tylko HSCT dawało szansę na trwałe wyleczenie z choroby nowotworowej u zdecydowanej większości dzieci z ALL oraz chromosomem Philadelphia. Ponieważ procedura transplantacyjna obarczona jest wysokim ryzykiem ciężkich powikłań aktualnie jest ona ostatnim etapem leczenia w opornych na leczenie podtypach białaczek.

Kolejnym przykładem skutecznej terapii celowanej może być zastosowanie inhibitora kinazy Janus (ruxolitini) w białaczkach z obecną mutacją genów JAK1 i JAK2.⁶

Podczas przeglądu piśmiennictwa dotyczącego nowych trendów diagnostycznych i terapeutycznych w onkologii i hematologii dziecięcej zauważyłem również rosnące znaczenie immunoterapii w leczeniu tej grupy chorób.^{7,8} Ponadto w ostatnich latach zaobserwowano poprawę wyleczalności przy zmniejszeniu trwałych powikłań tej terapii. Immunoterapia oraz celowana terapia molekularna stanowią już teraz nieodłączną część nowoczesnych protokołów terapeutycznych. Niemniej nie wszystkie opracowane metody leczenia przynoszą oczekiwany rezultat. Jednym z przykładów może być preparat o nazwie handlowej Ontak, będący połączeniem Interleukiny-2 oraz toksyny błonicy. Zadaniem tego leku było wybiórcze niszczenie komórek nowotworowych mających na swojej powierzchni receptor dla IL-2. Niestety, ze względu na ciężkie powikłania opisane po jego zastosowaniu (m.in. utrata wzroku) zaprzestano dystrybucji leku w USA w 2014 r.

Biorąc pod uwagę przedstawione powyżej fakty należy uznać, że podjęcie przeze mnie tematyki klasycznych czynników ryzyka w ostrych białaczkach dziecięcych już w rozprawie doktorskiej było dobrą decyzją i dało mi szansę na kontynuację badań o podobnej tematyce w chwili obecnej.

Aktualnie moje zainteresowania naukowe obejmują możliwość odkrycia nowych markerów biochemicznych prognozujących ostateczny efekt terapeutyczny, co pozwoliłoby na bardziej precyzyjne dobranie stosowanego leczenia oraz zmniejszenie efektów ubocznych zbyt intensywnej terapii. Ponadto interesująca jest również perspektywa odkrycia czynników, które zwiększają ryzyko wystąpienia ciężkich powikłań leczenia. Ich wyeliminowanie mogłoby mieć wpływ na ograniczenie niekorzystnych rokowniczo przerw w stosowanej chemioterapii. Dodatkowo też szybkie i precyzyjne określenie etiologii obserwowanych powikłań przyspieszyłoby włączenie właściwego leczenia, co tym samym poprawiłoby rokowanie u dziecka.

W procesie diagnostycznym i terapeutycznym ostrych białaczek uwaga lekarzy i naukowców skierowana jest przede wszystkim na komórkę blastyczną. Ocenia się jej cechy biologiczne oraz pośrednio wrażliwość na chemioterapię. Brakuje natomiast całościowego spojrzenia na mikrośrodowisko rozwijającego się nowotworu, w tym substancje biologicznie aktywne. Stosunkowo mało uwagi poświęca

się naturalnej odporności, która niewątpliwie ma ogromny wpływ na inicjację oraz progresję nowotworową, a także ostateczny efekt terapeutyczny. W tym aspekcie brakuje nam zarówno narzędzi jak i informacji, które by nam to umożliwiły.

Ponadto prowadzenie wartościowych naukowo badań w onkologii i hematologii dziecięcej jest utrudnione ze względu na trudności w zebraniu wystarczającej ilości próbek pobranych od chorych dzieci. Zapadalność na choroby nowotworowe u pacjentów poniżej 18 r.ż. jest niska w porównaniu do pacjentów dorosłych. Bardzo często też ciężki stan pacjenta w momencie rozpoznania ze względów etycznych zmusza nas do walki o jego życie i nie pozwala nam na prowadzenie badań naukowych.

W Polsce co roku na ostrą białaczkę limfoblastyczną zapada ok. 200 dzieci. Zebranie odpowiedniej grupy badawczej jest możliwe tylko dzięki współpracy wielu krajowych ośrodków naukowych i leczniczych. Tak więc opublikowanie interesujących obserwacji i analiz przynajmniej kilkusetosobowej grupy chorych odbywa się przy udziale wielu badaczy z praktycznie wszystkich polskich ośrodków naukowych zajmujących się leczeniem ostrej białaczki u dzieci.

Biorąc pod uwagę wszystkie powyższe obserwacje i fakty zaczerpnięte z piśmiennictwa naukowego postanowiłem w moich badaniach skupić się na analizie wybranych czynników immunologicznych, genetycznych oraz tych substancji biologicznie czynnych, które potencjalnie mają wpływ na występowanie powikłań stosowanej terapii oraz rokowanie u dzieci chorujących na ostrą białaczkę.

5.2. Opracowanie nowej metody analitycznej o potencjale diagnostycznym umożliwiającej jednoczesne oznaczenie wielu amin biogennych w małych objętościach płynów ustrojowych pobranych od pacjentów pediatrycznych chorujących na ALL.

Skuteczna realizacja moich celów badawczych wymagała opracowania nowych metod analitycznych, które umożliwiłyby oznaczenie śladowych ilości wybranych substancji biologicznie czynnych w małych objętościach płynów ustrojowych pobranych od chorych dzieci. Wśród budzących moje zainteresowanie związków znalazły się białka, aminokwasy, neurotransmitery, hormony oraz cytokiny oznaczane w płynie mózgowo-rdzeniowym (PMR), osoczu, pełnej krwi, moczu oraz kondensacie uzyskanym z wydychanego powietrza. Postawiony przeze mnie cel naukowy wymagał podjęcia wyzwań analitycznych, dlatego nawiązałem współpracę z zespołem badawczym kierowanym przez prof. dr hab. Tomasza Bączka oraz dr hab. Lucynę Konieczną z Katedry i Zakładu Chemii Farmaceutycznej Wydziału Farmaceutycznego Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego.

Na tym etapie mojej pracy naukowej opracowaliśmy nową strategię analityczną dla oceny 13-tu substancji biologicznie czynnych - amin biogennych, ich prekursorów i metabolitów, co

zaprezentowaliśmy w publikacji *Lucyna Konieczna, Anna Roszkowska, Maciej Niedzwiecki, Tomasz Bączek. Hydrophilic interaction chromatography combined with dispersive liquid-liquid microextraction as a preconcentration tool for the simultaneous determination of the panel of underivatized neurotransmitters in human urine samples. J. Chromatogr. A 2016; vol. 1431, s. 111-121. (IF:3,981; MNISZW:40.000).*

Prezentowana metoda pozwala na szybką, wydajną i jednoczesną analizę panelu biologicznie aktywnych neuroprzekaźników w płynach ustrojowych pobranych od dzieci chorujących na ostre białaczki. Uzyskane dzięki niej wyniki pozwalają na poszukiwanie korelacji oznaczonych substancji ze znanymi czynnikami prognostycznymi oraz obserwowanymi powikłaniami leczenia. Według naszej najlepszej wiedzy jest to pierwsze badanie implementujące technikę dyspersyjnej mikroekstrakcji ciecz-ciecz (dispersive liquid-liquid microextraction, DLLME) do równoczesnego oznaczenia 13-tu związków o budowie polarnej i różnych właściwościach kwasowo-zasadowych. Z piśmiennictwa wiadomo, że stwierdzone w badaniach odchylenia od prawidłowych poziomów amin biogennych są zwykle związane z określonymi chorobami jak białaczka⁹ oraz niektóre guzy nowotworowe, w tym guz chromochłonny, paraganglioma i nerwiak zarodkowy¹⁰⁻¹². Jednoczesny pomiar wielu amin biogennych w różnych matrycach biologicznych ma wartość kliniczną dla diagnozy i monitorowania wielu zaburzeń.¹³

Istotną dla nas informacją był fakt istnienia tylko jednego doniesienia naukowego oceniającego korelacje białaczek z poziomem neurotransmiterów.⁹ Z tego powodu postanowiliśmy w przyszłości kontynuować nasze badania przy pomocy opracowanej metody na większej grupie pacjentów. W kolejnym etapie porównamy uzyskane parametry ze znanymi czynnikami ryzyka w ALL u dzieci.

W zaprezentowanym cyklu oznaczeń zastosowaliśmy prostą i wydajną metodę dyspersyjnej mikroekstrakcji DLLME, a następnie technikę chromatografii cieczowej oddziaływań hydrofilowych (HILIC) w połączeniu ze spektrometrią mas (LC-MS). Takie rozwiązanie z wykorzystaniem kolumny z polarnym wypełnieniem typu HILIC umożliwiło rozdzielenie związków małowcząsteczkowych o budowie polarnej, jakimi są neurotransmitery, których analiza nie byłaby możliwa w tradycyjnym odwróconym układzie faz RP ze względu na zbyt krótkie czasy retencji i niepożądany efekt pojawienia się pików w czasie martwym. Powyższe metody dostosowano do równoczesnego oznaczania 13 związków o różnej polarności, zawierających neuroprzekaźniki monoaminowe (dopaminę, norepinefrynę, adrenalinę i serotoninę), wraz z ich odpowiednimi prekursorami i metabolitami. Do badań nad powyższą metodą oznaczeń wybraliśmy mocz jako materiał badawczy pobrany w sposób nieinwazyjny, nieobciążający dzieci chorujących na ostrą białaczkę limfoblastyczną.

Procedura dyspersyjnej mikroekstrakcji ciecz-ciecz (DLLME) opierała się na szybkim wstrzyknięciu mieszaniny etanolu (rozpuszczalnik dyspergujący) i dichlorometanu (rozpuszczalnik

ekstrahujący) bezpośrednio do próbki moczu ludzkiego, tworząc w mikroprobówce wirówkowej mętny roztwór. Po odwirowaniu i rozdzieleniu faz, fazę sedymentacyjną osadzoną w postaci kropli na dnie próbki wirówkowej pobrano za pomocą strzykawki, a następnie poddano analizie metodą LC-HILIC-MS. Etap wstępny odbywał się bez potrzeby etapu wcześniejszej derywatywacji. Całkowity czas pojedynczego oznaczenia wynosił ok. 12 minut. Do rozdzielania chromatograficznego analizowanych związków zastosowano kolumnę XBridge Amide™ BEH typu HILIC o wymiarach 3,0 x 100 mm, 3,5 μm, a faza ruchoma składała się z 10 mM mrówczanu amonu w wodzie pH 3,0 (faza A) oraz 10 mM mrówczanu amonu w acetonitrylu (faza B). Celem jednoczesnej analizy panelu neurotransmiterów i ich prekursorów, wykorzystano tryb pracy detektora mas w jonizacji dodatniej dla 10-ciu analitów: tyrozyny, tryptofanu, 5-hydroksytryptofanu, dopaminy, adrenaliny, norepinefryny, serotoniny, 3-metoksytyraminy, kwasu 5-hydroksyindolo-3-octowego, 3,4-dihydroksy-1-fenylalaniny i norwaliny jako wzorca wewnętrznego oraz w jonizacji ujemnej dla kwasów: wanilinomigdałowego, homowanilinowego, 3,4-dihydroksyfenylooctowego i 3,4-dihydroksybenzyloaminy jako wzorca wewnętrznego. Aby zapewnić wysoką jakość i rzetelność wykonywanych oznaczeń, szczegółowej analizie poddano parametry wpływające zarówno na etap przygotowania próbki - mikroekstrakcję DLLME, jak i na proces chromatograficzny w połączeniu z detekcją mas- LC-HILIC/MS. Metoda podlegała pełnej ocenie statystycznej (walidacji) zgodnie z wytycznymi FDA oraz EMEA i spełnia wszystkie kryteria wymagane dla metod bioanalitycznych. Zaproponowana metoda analityczna w optymalnych warunkach charakteryzuje się niską granicą wykrywalności (5-10 ng/mL) i wykazuje dobrą liniowość ze współczynnikiem korelacji R mieszczącym się w przedziale od 0,9991 do 0,9998. Wysokie wartości odzysków dla wszystkich badanych amin biogennych w próbkach moczu z dodatkiem roztworów wzorcowych przed ekstrakcją, obliczone w odniesieniu do próbek analitów po ekstrakcji, wynoszące $99,0\% \pm 3,6\%$ odzwierciedlają rzeczywistą wydajność ekstrakcji, wolną od wpływu matrycy biologicznej.

5.2.1. Podsumowanie, wnioski i plany na przyszłość:

Dzięki podjętej przez nas współpracy opracowaliśmy nową procedurę (DLLME-LC-HILIC-MS) służącą do równoczesnego oznaczania śladowych ilości polarnych związków endogennych, np. neuroprzekazników monoaminowych (dopaminy, noradrenaliny, epinefryny i serotoniny) wraz z ich odpowiednimi prekursorami i metabolitami, w ludzkich próbkach moczu bez etapu derywatywacji. Wyłączenie etapu upochadniania pozwoliło na uniknięcie kosztów związanych z zakupem odczynników derywatywujących, znaczne uproszczenie i skrócenie czasu przygotowania próbki do analizy LC-MS oraz zmniejszenie nakładu pracy analityka. Piśmiennictwo wskazuje, że główną zaletą metody jest równoległa analiza 13 amin biologicznych. Aktualnie dostępne publikacje odnoszą się tylko do metod oznaczających jednocześnie najwyżej kilka neuroprzekazników, głównie katecholamin i serotoniny. Rozwinięta metoda wykazała dobrą liniowość i powtarzalność oraz okazała się selektywna, czuła, ekonomiczna i przyjazna dla

środowiska. Otrzymane wyniki nowej metody LC-HILIC-MS z etapem wstępnej mikroekstracji i zateżania analitów techniką DLLME są niezawodne i mają ogromny potencjał jako narzędzie diagnostyczne w bioanalizie panelu neuroprzekaźników w złożonych matrycach biologicznych, takich jak np. mocz, ślina i płyn mózgowo-rdzeniowy celem diagnozowania choroby i monitorowania terapii. Opracowana metoda ma szczególną wartość diagnostyczną w przypadku pacjentów pediatrycznych oraz małej objętości materiału pobranego do badań. W nieodległej przyszłości planujemy wdrożenie opracowanej przez nasz zespół metody do oceny korelacji oznaczanych w płynach ustrojowych substancji biologicznie czynnych z cechami biologicznymi komórek nowotworowych, znanymi czynnikami ryzyka, a przede wszystkim obserwowanymi powikłaniami leczenia oraz ostatecznym efektem terapeutycznym.

5.3. Poszukiwanie nowych biomarkerów w kondensatach wydychanego powietrza pobranego od dzieci z ALL przy użyciu metod chromatograficznych.

Kontynuując badania mające na celu wykorzystanie metod chromatograficznych w poszukiwaniu nieznanych biomarkerów choroby nowotworowej podjąłem także wraz z zespołem nowatorskie badania nad aminokwasami obecnymi w powietrzu wydychanym przez dzieci z ALL.

Dzięki współpracy z Fundacją GetResponse Cares pozyskałem środki na zakup aparatu do zbierania kondensatów wydychanego powietrza oraz odczynników niezbędnych do wykonania badań. W przypadku uzyskania interesujących wyników byłaby to wartościowa oraz całkowicie bezinwazyjna metoda umożliwiająca analizę substancji nielotnych, jakimi są aminokwasy w skroplinach (kondensatach) wydychanego powietrza. Posłużyłaby ona do analizy stopnia zaawansowania choroby nowotworowej, odpowiedzi na leczenie, bądź też monitorowania powikłań zastosowanej chemioterapii.

Przyjęty przeze mnie ostateczny cel badań nie był łatwy do osiągnięcia, ponieważ od potencjalnego biomarkera wymaga się odpowiedniej czułości i specyficzności, oraz przeprowadzenia jego walidacji, czyli potwierdzenia w oparciu początkowo o 10, potem 100, a następnie 1000 próbek. Poszukiwanie potencjalnych biomarkerów w próbkach wydechów, które charakteryzują się bardzo niskimi poziomami tych związków (rzędu pg), wymaga bardzo czulej, precyzyjnej i dokładnej metodyki, charakteryzującej się wysoką przepustowością. Ponadto doskonała metoda pozyskiwania materiału do badań powinna być nieinwazyjna, szybka, łatwa do wykonania dla dzieci w różnym wieku oraz tania, jeśli to możliwe. Naszym

zdaniem wszystkie te warunki spełnia opracowana przez nasz zespół metoda pobierania oraz analizowania kondensatu wydychanego powietrza.

Wstępne wyniki naszych badań zostały zaprezentowane w publikacji *L. Konieczna, M. Pyszka, M. Okońska, Maciej Niedźwiecki, T. Bączek Bioanalysis of underivatized amino acids in non-invasive exhaled*

środowiska. Otrzymane wyniki nowej metody LC-HILIC-MS z etapem wstępnej mikroekstracji i zateżania analitów techniką DLLME są niezawodne i mają ogromny potencjał jako narzędzie diagnostyczne w bioanalizie panelu neuroprzebiegów w złożonych matrycach biologicznych, takich jak np. mocz, ślina i płyn mózgowo-rdzeniowy celem diagnozowania choroby i monitorowania terapii. Opracowana metoda ma szczególną wartość diagnostyczną w przypadku pacjentów pediatrycznych oraz małej objętości materiału pobranego do badań. W nieodległej przyszłości planujemy wdrożenie opracowanej przez nasz zespół metody do oceny korelacji oznaczanych w płynach ustrojowych substancji biologicznie czynnych z cechami biologicznymi komórek nowotworowych, znanymi czynnikami ryzyka, a przede wszystkim obserwowanymi powikłaniami leczenia oraz ostatecznym efektem terapeutycznym.

5.3. Poszukiwanie nowych biomarkerów w kondensatach wydychanego powietrza pobranego od dzieci z ALL przy użyciu metod chromatograficznych.

Kontynuując badania mające na celu wykorzystanie metod chromatograficznych w poszukiwaniu nieznanych biomarkerów choroby nowotworowej podjąłem także wraz z zespołem nowatorskie badania nad aminokwasami obecnymi w powietrzu wydychanym przez dzieci z ALL.

Dzięki współpracy z Fundacją GetResponse Cares pozyskałem środki na zakup aparatu do zbierania kondensatów wydychanego powietrza oraz odczynników niezbędnych do wykonania badań. W przypadku uzyskania interesujących wyników byłaby to wartościowa oraz całkowicie bezinwazyjna metoda umożliwiająca analizę substancji nielotnych, jakimi są aminokwasy w skroplinach (kondensatach) wydychanego powietrza. Posłużyłaby ona do analizy stopnia zaawansowania choroby nowotworowej, odpowiedzi na leczenie, bądź też monitorowania powikłań zastosowanej chemioterapii.

Przyjęty przeze mnie ostateczny cel badań nie był łatwy do osiągnięcia, ponieważ od potencjalnego biomarkera wymaga się odpowiedniej czułości i specyficzności, oraz przeprowadzenia jego walidacji, czyli potwierdzenia w oparciu początkowo o 10, potem 100, a następnie 1000 próbek. Poszukiwanie potencjalnych biomarkerów w próbkach wydechów, które charakteryzują się bardzo niskimi poziomami tych związków (rzędu pg), wymaga bardzo czułej, precyzyjnej i dokładnej metodyki, charakteryzującej się wysoką przepustowością. Ponadto doskonała metoda pozyskiwania materiału do badań powinna być nieinwazyjna, szybka, łatwa do wykonania dla dzieci w różnym wieku oraz tania, jeśli to możliwe. Naszym zdaniem wszystkie te warunki spełnia opracowana przez nasz zespół metoda pobierania oraz analizowania kondensatu wydychanego powietrza.

Wstępne wyniki naszych badań zostały zaprezentowane w publikacji *L. Konieczna, M. Pyszka, M. Okońska, Maciej Niedzwiecki, T. Bączek Bioanalysis of underivatized amino acids in non-invasive exhaled*

breath condensate samples using liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. J. Chromatogr. A 2018; vol. 1542, s. 72-81.

W pracy zaprezentowaliśmy możliwość jednoczesnego oznaczania panelu aminokwasów w powietrzu wydychanym pobranym od dzieci chorujących na ALL. Uzyskane wyniki zapoczątkowały kolejne, aktualnie realizowane analizy i być może pozwolą nam na opracowanie nowych strategii diagnostycznych i terapeutycznych. Mam nadzieję, że wyniki tych badań umożliwią monitorowanie leczenia oraz szybkie wykrycie ciężkich powikłań infekcyjnych układu oddechowego w trakcie wysoko dawkowanej chemioterapii za pomocą prostej, czulej i niedrożej metody.

Zainteresowanie aminokwasami i białkami w kontekście leczenia ALL wynika z naszej wiedzy i doświadczenia zdobytego w trakcie podaży L-Asparaginazy, jednego z podstawowych cytostatyków w leczeniu tego podtypu białaczki u dzieci i dorosłych. L-Asparaginaza katalizuje rozszczepienie L-asparaginy do kwasu asparaginowego i amoniaku. Powoduje on deplecję tego aminokwasu w środowisku nowotworu oraz wewnątrz komórki, co z kolei prowadzi do zahamowania syntezy białek i zahamowania proliferacji komórek. Badania wskazują, że komórka białaczkowa jest szczególnie wrażliwa na niedobór L-asparaginy w pomiototycznej fazie G1 cyklu komórkowego.¹⁴

Co ciekawe, L-Asparaginaza może powodować również deplecję glutaminy, co ma prawdopodobnie związek z mechanizmem działania toksycznego i terapeutycznego tego leku. Badania wskazują również na duże znaczenie dla skuteczności terapeutycznej L-Asparaginazy mikrośrodowiska szpiku, które tworzą m.in. komórki mezenchymalne. Obserwowane zależności pozwalają nam przypuszczać, że poza L-asparaginą i glutaminą znaczenie w inicjacji, proliferacji i apoptozie komórek nowotworowych mogą mieć inne substancje biologicznie czynne, w tym liczne aminokwasy. Co więcej, być może uda się zastosować nasze wyniki w opracowaniu nowych leków p-nowotworowych, co pomoże w leczeniu tej grupy chorób.

Wystąpienie u dziecka z ostrą białaczką ciężkiego zakażenia układu oddechowego pod postacią infekcji wirusowej, bakteryjnej, a zwłaszcza grzybiczej powoduje zwykle konieczność przerwania terapii, a to z kolei skutkuje pogorszeniem rokowania. Dlatego też szybka diagnostyka i włączenie odpowiedniego leczenia infekcji jest niezwykle ważne. Przypuszczamy, że wybrane aminokwasy mogłyby pełnić rolę potencjalnego biomarkera takiego zakażenia.

W odróżnieniu od badaczy oceniających zwykle pojedyncze aminokwasy po raz pierwszy analizie poddaliśmy jednoczasowo panel 23 aminokwasów występujących w kondensacie wydychanego powietrza. Celem naszych badań była optymalizacja szybkiej i czulej metody wykorzystującej LC-MS/MS. Stąd zaproponowaliśmy po raz pierwszy prostą, jednoetapową metodę przygotowania próbki przed analizą chromatograficzną polegającą tylko na odparowaniu kondensatu do suchej pozostałości w ściśle

kontrolowanych warunkach próżniowych. W odniesieniu do wcześniejszych metod opisanych w literaturze, zabieg ten pozwolił na skrócenie czasu analizy i znaczące obniżenie kosztów związanych z zakupem np. rozpuszczalników do ekstrakcji ciecz-ciecz (liquid-liquid extraction, LLE) czy kolumnienek do ekstrakcji do fazy stałej (solid-phase extraction, SPE).

Badanie przeprowadzono wśród pacjentów z ALL w wieku od 1 do 18 r.ż., natomiast uzyskane wyniki porównano ze zdrowymi ochotnikami w tym samym wieku. Analizie poddano próbki pobrane od pacjentów w dniu rozpoczęcia leczenia/postawienia diagnozy (doba 0) oraz po uzyskaniu remisji choroby nowotworowej (doba 33).

Analiza statystyczna wykazała statystycznie znamiennej różnicę w poziomie 11 aminokwasów pomiędzy chorymi dziećmi z ALL a dziećmi z grupy kontrolnej. W wydychanym powietrzu u dzieci z białaczką wykazaliśmy wyższy poziom argininy, asparaginy, glutaminy, histydyny, homoargininy, metioniny, proliny, hydroksyproliny, treoniny, tyrozyny i waliny w odniesieniu do zdrowych rówieśników.

Wyniki wcześniejszych naszych badań oceniających poziom aminokwasów w surowicy i PMR u dzieci z ALL, które aktualnie są w przygotowaniu do publikacji, wskazywały na statystycznie istotnie podwyższony poziom tylko dwóch aminokwasów, glutaminy i hydroksyproliny. Obserwacja ta wymaga wyjaśnienia w trakcie kolejnych badań i dalszych analiz, które aktualnie są prowadzone.

5.3.1. Podsumowanie, wnioski i plany na przyszłość:

Zgodnie z moją wiedzą zaprezentowane w publikacji wyniki są pierwszym tego typu badaniem oceniającym jednocześnie 23 aminokwasy w wydychanym powietrzu dzieci chorych na ostrą białaczkę limfoblastyczną w oparciu o metodę LC-MS/MS. Zaproponowana przez nasz zespół metoda jest zoptymalizowaną, czułą, specyficzną i selektywną. Tym samym spełnia wymogi stawiane przed tego typu badaniami diagnostycznymi. Dużą jej zaletą jest możliwość rutynowej, bezinwazyjnej i częstej kontroli poziomu aminokwasów w wydychanym powietrzu różnych grup pacjentów.

Jednocześnie uzyskane wyniki kierują naszą szczególną uwagę na aminokwasy oraz inne substancje biologicznie czynne w grupie dzieci z chorobami rozrostowymi układu krwiotwórczego, co pozwala nam zaplanować kolejne panele badań u naszych pacjentów. W następnym etapie badań ocenimy poziomy wybranych substancji biologicznie czynnych w różnych materiałach biologicznych (krew, mocz, PMR, kondensat powietrza wydychanego) na różnych etapach leczenia choroby nowotworowej. Uzyskane wyniki odniesiemy do obserwowanych powikłań chemioterapii, wczesnej odpowiedzi na leczenie oraz ostatecznego wyniku terapeutycznego. Ostatecznie przeprowadzimy analizę statystyczną uzyskanych wyników poziomów aminokwasów w odniesieniu do znanych czynników ryzyka. Szczególną grupą

analizowanych pacjentów będą dzieci z powikłaniami infekcyjnymi górnych dróg oddechowych, w tym z inwazyjną grzybicą narządową.

Gdański Uniwersytet Medyczny wystąpił o krajową oraz międzynarodową ochronę patentową dla opracowanego przez nasz zespół sposobu oznaczania aminokwasów w przebiegu ALL poprzez ich monitorowanie w nieinwazyjnie pobranych kondensatach wydychanego powietrza.

5.4. Poszukiwanie nowych markerów immunologicznych we krwi obwodowej i szpiku kostnym pobranym od dzieci z ALL przy użyciu cytometrii przepływowej.

Od wielu lat wiemy, że sprawny układ immunologiczny jest warunkiem uzyskania trwałej remisji choroby nowotworowej. Wrodzone niedobory odporności u dziecka z ostrą białaczką powodują, że wyleczenie jest praktycznie niemożliwe. Ponadto immunoterapia przeciwnowotworowa np. przeciwciałami monoklonalnymi jest coraz częściej stosowana i w wybranych wypadkach stanowi jedyną opcję terapeutyczną dającą szansę na uzyskanie trwałej remisji choroby.^{7,15}

Dlatego też dalsze szczegółowe badania wybranych elementów układu immunologicznego są bardzo istotne dla uzyskania poprawy wyleczalności choroby nowotworowej w połączeniu ze zmniejszeniem toksyczności chemio- i radioterapii. Wskazują na to dotychczasowe badania naukowców zajmujących się immunologią nowotworów.

Konsekwentnie uznałem wybrane komórki immunokompetentne za bardzo istotne w diagnostyce i terapii p-nowotworowej. Z tego powodu rozpocząłem badania nad komórkami regulatorowymi w ALL. Moje szczególne zainteresowanie wzbudził temat jednego z najciekawszych podtypów komórek regulatorowych. Są to limfocyty regulatorowe linii T (Treg).

Uzyskane przez nas wstępne wyniki potwierdziły moje przypuszczenia i zostały zaprezentowane w publikacji Niedzwiecki et al., zatytułowanej *CD4⁺CD25^{high}CD127^{low/-}FoxP3⁺ regulatory T cell subpopulations in the bone marrow and peripheral blood of children with ALL: brief report. J. Immunol. Res. 2018; vol. 2018*. Zaprezentowane dane przedstawiały m.in. korelację wybranych elementów układu immunologicznego z cechami biologicznymi komórki białaczkowej oraz odpowiedzią na zastosowane leczenie.

W analizowanym piśmiennictwie większość badaczy oceniała odsetek komórek Treg we krwi obwodowej bądź tkance nowotworowej, stwierdzając podwyższony odsetek tych komórek w porównaniu do osób zdrowych.¹⁶ Przyjąłem, że taką tkanką nowotworową w ostrych białaczkach jest szpik kostny i

zgodnie z obserwacjami innych autorów to tam właśnie powinniśmy wykryć wyższy niż we krwi obwodowej odsetek komórek Treg.

Ogromną zaletą naszego badania było zastosowanie pełnego panelu p-ciał do precyzyjnego oznaczenia komórek o fenotypie $CD4^+CD25^{high}CD127^{low/-}FoxP3^+$ w analizowanym szpiku kostnym oraz krwi obwodowej 45 dzieci chorujących na ALL. Zbadaliśmy również korelację odsetka komórek Treg z wykładnikami hematologicznymi ALL oraz odpowiedzią na zastosowaną chemioterapię. Wykryliśmy kilka bardzo interesujących zależności.

Jedną z nich była słaba ujemna korelacja z odsetkiem blastów we krwi obwodowej, co wskazywałoby na znaczenie rokownicze Treg i ich wpływ na stopień zaawansowania choroby nowotworowej. Za powyższą hipotezą przemawia również stwierdzona ujemna korelacja Treg w szpiku kostnym z poziomem blastozy we krwi obwodowej po 7 dniach wstępnej sterydoterapii. Parametr ten jest jednym z najważniejszych czynników rokowniczych w ALL u dzieci.¹⁷ Powszechnie wiadomo, że w 8 dobie leczenia bezwzględna blastoza nie powinna przekraczać 1 000/mm³. W przeciwnym wypadku dziecko jest kwalifikowane do grupy najwyższego ryzyka zgodnie z Protokołem ALLIC 2002 i ALLIC 2009. Kolejną wykrytą zależnością statystyczną była umiarkowana dodatnia korelacja z poziomem hemoglobiny w chwili rozpoznania.

Ponadto interesującą obserwacją była też słaba ujemna korelacja wykryta pomiędzy Treg i minimalną chorobą resztkową (MRD) w 15 dobie chemioterapii. Jak wiemy MRD jest powszechnie uznanym parametrem określającym wrażliwość komórek białaczkowych na stosowaną chemioterapię.¹⁸ Podobną ujemną korelację wykryliśmy pomiędzy Treg oraz odsetkiem blastów w szpiku kostnym w chwili diagnozy oraz leukocytozą w 15 dobie chemioterapii.

Tak jak przypuszczałem, odsetek limfocytów Treg w szpiku kostnym był wyższy niż we krwi obwodowej dzieci z rozpoznaniem ALL. Odpowiadały za to przede wszystkim tzw. memory-Treg, czyli subpopulacja pamięci mająca już za sobą kontakt z antygenem.

Uzyskane wyniki badań zachęciły mnie do analizy bazy PubMed pod kątem piśmiennictwa prezentującego wyniki badań innych autorów i odnoszących się do dziecięcej ALL oraz limfocytów regulatorowych. Wyniki tej analizy zostały zaprezentowane w ostatniej z cyklu pracy **Maciej Niedźwiecki, Oskar Budziło, Elżbieta Adamkiewicz-Drożyńska, Dorota Pawlik-Gwozdecka, Maciej Zieliński, Lucyna Maciejka-Kembłowska, Tomasz Szczepański, and Piotr Trzonkowski. $CD4^+CD25^{high}CD127^{low/-}FoxP3^+$ + regulatory T-cell population in acute leukemias - review of the literature. *J. Immunol. Res.* 2019; (IF:3,298; MNiSzW:25.000).**

Na wstępie analizy postawiłem sobie pytanie: czy uzyskane przez nasz zespół wyniki zaprezentowane w publikacji nr. 3 zostały opisane już przez innych autorów? Ponadto ze względu na plany kontynuacji badań oceniających wpływ komórek Treg na ostateczny efekt terapeutyczny w dziecięcej ALL oraz występujące w czasie leczenia powikłania poszukiwałem w bazie PubMed informacji na ten temat. Perspektywa zastosowania immunoterapii obejmującej subpopulację komórek regulatorowych jest niezwykle interesującą możliwością uzupełnienia klasycznej chemioterapii, co być może przyczyniłoby się do poprawy wyleczalności i zmniejszenia obserwowanych wczesnych i późnych powikłań chemioterapii.

W piśmiennictwie wielu autorów wskazuje na podwyższony odsetek komórek Tregs w kilku nowotworach litych. Przykładem mogą być nowotwory takich narządów jak płuca, piersi, jelito grube lub jajnik. Zdecydowanie rzadziej analizie poddawano choroby rozrostowe układu krwiotwórczego, a w szczególności sporadycznie udało się znaleźć doniesienia naukowe dotyczące pacjentów w wieku rozwojowy.^{16,19,20}

W doniesieniach naukowych wskazywano na podwyższony odsetek komórek regulatorowych zarówno w tkance nowotworowej, jak i we krwi obwodowej chorych.^{21,22} Co więcej, komórki te miały różny wpływ na prognozę trwałego wyleczenia w zależności od podtypu histopatologicznego nowotworu.²³

Dlatego też w naszej pracy postanowiliśmy przeanalizować podstawowe koncepcje dotyczące wpływu komórek Treg na powstanie i rozwój ALL. Już na wstępie analizy odkryliśmy bardzo interesujący fakt, mianowicie zauważyliśmy, że większość autorów do oznaczania subpopulacji limfocytów regulatorowych używała nieprawidłowego fenotypu. Zgodnie z aktualną wiedzą najbardziej właściwym jest fenotyp $CD4^+CD25^{high}CD127^{low}/FoxP3^+$ oznaczany metodą cytometrii przepływową i cechujący subpopulację limfocytów $CD4^+$ charakteryzującą się odrębnym profilem produkowanych cytokin, odrębnymi cechami biologicznymi oraz sobie tylko właściwą ontogenezą.²⁴ Szczegółowa analiza wskazuje na jeszcze jedną istotną cechę populacji komórek regulatorowych linii T. Składa się ona z kilku subpopulacji, wśród których najważniejsze są dwie: indukowane (iTreg) i naturalne (nTreg). Poza szczegółowym opisem subpopulacji limfocytów Treg w naszej pracy omówiliśmy również mechanizmy odpowiadające za właściwości supresyjne tych komórek, a także rolę cytokin oraz molekuł wykrywanych na ich powierzchni oraz w cytoplazmie. Piśmiennictwo wskazuje na kilka możliwości poprawy efektów terapeutycznych poprzez manipulacje na komórkach regulatorowych. Część autorów wskazuje na możliwość usunięcia komórek regulatorowych z mikrośrodowiska rozwijającego się nowotworu, co powodowałoby eliminację działania supresyjnego na własny układ immunologiczny walczący z chorobą.²⁵ Kolejną propozycją było terapeutyczne obniżenie zdolności supresyjnych tych komórek.¹⁵

W trakcie analizy doniesień naukowych znalezionych w bazie PubMed udało nam się znaleźć tylko kilka publikacji dotyczących bezpośrednio Treg w ostrych białaczkach dziecięcych. Jednym z takich

autorów był Lustfeld et al.²⁶, który odkrył korelację pomiędzy podwyższonym współczynnikiem CD4/CD8 w momencie diagnozy oraz rokowaniem, a także wpływu komórek non-Treg CD4+ na czas uzyskania remisji białaczki. Nie udało się natomiast powiązać poziomu Treg z rokowaniem w ALL u dzieci.

Kolejne dwie prace autorstwa Salem et al.²⁷ z 2016 i 2018 roku dotyczyły również Treg w ALL u dzieci, ale moim zdaniem przyjęty przez badaczy fenotyp CD4+CD25+CD127- był zbyt wąski, aby precyzyjnie ocenić komórki regulatorowe linii T. Autor oznaczał odsetek komórek Treg we krwi obwodowej 45 dzieci chorujących na ALL. Podobny wynik, czyli podwyższony odsetek komórek o tym samym fenotypie CD4+CD25+CD127-, wykrył Wu et al.²⁸ zarówno przed, jak i po uzyskaniu remisji w porównaniu do grupy kontrolnej. Niemniej osiągnięcie remisji w tym wypadku wiązało się z obniżeniem odsetka interesujących nas subpopulacji komórek immunokompetentnych.

Pozostali autorzy analizowali komórki Treg u pacjentów dorosłych. Badania obarczone były dużym marginesem błędu ze względu na małe grupy badawcze oraz fakt kwalifikacji do badań białaczek wywodzących się zarówno z linii T, jak i B.²⁸⁻³¹ Niemniej ogromną zaletą prowadzonych przez tych autorów badań było potwierdzenie dużego znaczenia interleukin IL-2, IL-10 and TGF-beta w mechanizmie supresji generowanej przez komórki Treg. Część badań wskazuje również na wyższą ekspresję na tych komórkach antygenu FoxP₃, który odgrywa kluczową rolę w uzyskiwaniu właściwości biologicznych komórek regulatorowych.³²

Ze względu na fakt, że zdecydowanie więcej doniesień naukowych dotyczyło znaczenia komórek Treg w przewlekłych białaczkach limfatycznych i szpikowych postanowiłem przeanalizować również piśmiennictwo dotyczące powyższego zagadnienia. Obserwacje były podobne do tych, które poczyniono w badaniach nad ostrymi białaczkami.³³

Podsumowując przeprowadzoną analizę, subpopulacja limfocytów regulatorowych linii T stanowi niezwykle atrakcyjną dla lekarzy linię komórkową pod względem wykorzystania ich do walki z rozwijającą się chorobą rozrostową układu krwiotwórczego. Działaniem modulującym można spowodować zwiększenie odsetka komórek Treg lub wręcz przeciwnie, ich eliminację z mikrośrodowiska nowotworu. Może również obejmować podwyższenie lub obniżenia zdolności immunosupresyjnych tych komórek. To jakie działanie terapeutyczne wybierzemy uzależnione jest najprawdopodobniej od podtypu histopatologicznego nowotworu, a także najprawdopodobniej od etapu leczenia, na którym znajduje się pacjent. Do takich wniosków skłaniają nas poczynione przez badaczy obserwacje dotyczące wpływu na rozwijający się nowotwór. W zależności od podtypu histopatologicznego guza komórki Treg mogły mieć promujący, bądź też hamujący wpływ na komórki nowotworu.^{21,34} Jednakże w większości badań podwyższony odsetek Treg wiąże się z gorszą odpowiedzią na leczenie. Dodatkowym problemem w wiarygodnej ocenie wyników uzyskanych przez różnych badaczy jest fakt analizowania Treg w pełnym

szpiku kostnym lub też we krwi obwodowej. Część badaczy poddała analizie odsetek komórek Treg w jednojądrzastej populacji komórek, pozostali w całej populacji komórek. Kolejnym problemem w wiarygodnej ocenie Treg jest również niejasny wpływ chemioterapii na odsetek komórek regulatorowych w szpiku kostnym i krwi obwodowej dzieci chorujących na ostre białaczki.^{34,35}

Na zakończenie naszej pracy postanowiliśmy zwizualizować proces ontogenezy komórek regulatorowych wywodzących się z linii T, co jest niewątpliwie jedną z zalet publikacji.

5.4.1. Podsumowanie, wnioski i plany na przyszłość.

W naszym badaniu wykazaliśmy obecność zaburzeń odsetka komórek Treg w szpiku kostnym i krwi obwodowej dzieci z rozpoznaniem ALL. W porównaniu do pozostałych badaczy zajmujących się tą tematyką jako jedni z nielicznych zastosowaliśmy pełen panel p-ciał umożliwiający nam precyzyjne oznaczenie Treg.

Analiza statystyczna wykazała korelację odsetka Treg z wybranymi cechami biologicznymi ALL, a także pośrednio ich wpływ na wczesną odpowiedź na leczenie. Uzyskane wyniki potwierdzają konieczność prowadzenia dalszych badań nad znaczeniem komórek regulatorowych linii T (Treg) w ostrych białaczkach dziecięcych. W kolejnym etapie badań planujemy wykonanie wieloczynnikowej analizy statystycznej zależności występującej pomiędzy komórkami Treg, czynnikami ryzyka ALL, powikłaniami leczenia oraz aminami biogennymi oznaczonymi za pomocą opracowanych przez nas metod chromatograficznych. Planujemy również wykonać podobne analizy w odniesieniu do komórek regulatorowych linii B (Breg). Sądzę, że prowadzone przez nas badania przyczynią się do znalezienia nowych czynników ryzyka, a tym samym lepszą personalizację stosowanego leczenia.

Aby uzyskane wyniki były wiarygodne musimy zastosować jednolity panel przeciwciał określających precyzyjnie analizowaną subpopulację komórek, zwiększyć liczebność grup badawczych i być może włączyć do analizy pacjentów dorosłych. Odniesienie uzyskanych wyników do pozostałych znanych czynników ryzyka w ALL oraz odpowiedzi na zastosowaną terapię przyniesie odpowiedź na pytanie, czy zmiany obserwowane w naszych badaniach są skutkiem czy przyczyną choroby.

6. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych wraz z analizą bibliometryczną:

Listę publikacji nie wchodzących w skład osiągnięcia w rozumieniu art.16 ust.2 ustawy z dnia 14.03.2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz.595 ze zm.) załączono jako odrębny dokument (załącznik nr 2.).

Analiza bibliometryczna:

<i>Sumaryczna wartość Impact Factor</i>	42,623
<i>po uzyskaniu stopnia doktora</i>	42,623
<i>Sumaryczna wartość punktów MNiSW</i>	376
<i>po uzyskaniu stopnia doktora</i>	372
<i>Liczba cytowań według Web of Science</i>	120
<i>bez autocytowań</i>	119
<i>Liczba cytowań według Scopus</i>	151
<i>bez autocytowań</i>	150
<i>Index h według bazy Scopus</i>	7

Podsumowanie działalności naukowo-badawczej przedstawia szczegółowa analiza bibliometryczna opracowana przez Pracownię Bibliograficzną Biblioteki Głównej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego z dnia 07.03.2019 r. zamieszczona w załączniku nr 3.

Tematyka moich badań i analiz naukowych związana była z wybraną specjalizacją oraz miejscem pracy zawodowej już od momentu zakończenia stażu podyplomowego. Początkowo zajmowałem się szeroko pojętą pediatrią, w tym tematami związanymi z diabetologią, endokrynologią, hematologią nieonkologiczną oraz opieką paliatywną nad dziećmi. W tym okresie opublikowałem swoje pierwsze prace naukowe, których przykładem może być prezentacja dzieci po ostrym zatruciu związkami chemicznymi, problemy związane ze stosowaniem żywienia enteralnego przez PEG-a oraz trudności w diagnozowaniu trudnych przypadków pediatrycznych.

- *E. Wasilewska, [i in.] Maciej Niedźwiecki. Ostre zatrucia związkami chemicznymi u dzieci poniżej 2 roku życia: opis 4 przypadków. Pediatr. Pol. 2003. (MNiSzW=4.000).*
- *P. Landowski [i in.], Maciej Niedźwiecki. Korzyści i powikłania wynikające ze stosowania przezskórnej endoskopowej gastrostomii w enteralnym żywieniu dzieci. Gastroenterol. Pol. 2008.*
- *Maciej Niedźwiecki [i in.]. Maski kliniczne chorób rozrostowych układu krwiotwórczego u dzieci: prezentacja przypadków. Forum Med. Rodz. 2009.*

Z biegiem czasu moje badania skupiły się na onkohematologii dziecięcej, w której zajmowałem się przede wszystkim zagadnieniami diagnostyki cytometrycznej i genetycznej ostrej białaczki

limfoblastycznej. Przez wiele lat odpowiedzialny byłem za koordynację leczenia oraz gromadzenie danych klinicznych dzieci leczonych w klinice według protokołów ALLIC 2002 i ALLIC 2009 r. Aktualnie odpowiadam z ramienia naszej kliniki za leczenie podtrzymujące ALL u dzieci zgodnie z projektem badawczym "Personalizacja leczenia ostrej białaczki limfoblastycznej u dzieci w Polsce" tzw. PersonALL. Nazwa programu, w ramach którego projekt jest realizowany, to „Profilaktyka i leczenie chorób cywilizacyjnych” - STRATEGMED III NCBR.

Podsumowując, poza zagadnieniami przedstawionymi w cyklu prac stanowiących osiągnięcie habilitacyjne w obrębie moich zainteresowań naukowych znajdują się następujące tematy:

- Diagnostyka cytometryczna oraz genetyczna ostrych białaczek dziecięcych.
- Diagnostyka oraz leczenie chorób rozrostowych układu krwiotwórczego u pacjentów do 18 roku życia oraz obserwowane powikłania terapii.
- Diagnostyka i leczenie guzów litych u pacjentów do 18 roku życia oraz obserwowane powikłania terapii.
- Immunologia kliniczna obejmująca diagnostykę i leczenie niedoborów immunologicznych oraz chorób z autoagresji.

6.1. Ostra białaczka limfoblastyczna (ALL) u dzieci – wybrane zagadnienia diagnostyki i terapii.

6.1.1. Diagnostyka cytometryczna ostrych białaczek dziecięcych.

Po ukończeniu stażu podyplomowego rozpocząłem pracę w Klinice Pediatrii, Hematologii, Onkologii i Endokrynologii Akademii Medycznej w Gdańsku, która została przekształcona następnie w Klinikę Pediatrii, Hematologii i Onkologii UCK/GUMED. Wtedy też rozpocząłem studia doktoranckie na Gdańskim Uniwersytecie Medycznym oraz zbieranie materiału do mojej pracy doktorskiej. Tematyka prac obejmowała zagadnienia diagnostyki immunologicznej i genetycznej ostrych białaczek dziecięcych. Analizowałem również wpływ poszczególnych czynników ryzyka na ostateczny efekt terapeutyczny w tej grupie pacjentów.

W kolejnych latach naturalną konsekwencją było kontynuowanie przeze mnie badań obejmujących zagadnienia immunofenotypizacji ostrych białaczek dziecięcych. W latach 2004 - 2015 byłem odpowiedzialny w Klinice Pediatrii, Hematologii i Onkologii GUMED za diagnostykę cytometryczną chorób rozrostowych układu krwiotwórczego, którą prowadziłem we współpracy z dr n. med. Maciejem Zielińskim z Laboratorium Immunologii Klinicznej UCK/GUMED. W tym okresie pełniłem funkcję Z-cy Kierownika Pracowni Hematologicznej przy Klinice. W celu podnoszenia kwalifikacji zawodowych wielokrotnie uczestniczyłem w krajowych oraz międzynarodowych konferencjach i szkoleniach obejmujących tematykę cytometrii przepływową. Za najważniejsze należy uznać czynne uczestnictwo w

spotkaniach międzynarodowej grupy IBFM, której głównym zadaniem była koordynacja diagnostyki i leczenia ALL u dzieci w Polsce i na świecie zgodnie z protokołem ALLIC 2002 oraz ALLIC 2009. Ponadto z ramienia gdańskiej kliniki corocznie uczestniczyłem w spotkaniach koordynujących program kontroli jakości w badaniach genetycznych i cytometrycznych w diagnostyce ostrych białaczek dziecięcych. Program ten był finansowany przez Ministerstwo Zdrowia.

Jedną z pierwszych opublikowanych przeze mnie prac omawiających różne aspekty fenotypowania populacji limfoblastów była praca omawiająca ekspresję antygenów CD34 na komórkach macierzystych w trakcie leczenia ALL – *I. Reszczyńska [i in.], Maciej Niedźwiecki. Wstępna ocena ekspresji antygeny CD34 na komórkach macierzystych krwi obwodowej w przebiegu leczenia ostrej białaczki limfoblastycznej u dzieci. Nowa Pediatria. 2011. (MNiSzW=2.000).*

W kolejnych latach dzięki naukowej i organizacyjnej wielośrodkowej współpracy powstało kilka interesujących publikacji naukowych, charakteryzujących specyfikę diagnostyki cytometrycznej ostrych białaczek u dzieci. W pracy *A. Pituch-Noworolska [i in.], Maciej Niedźwiecki. The frequency and characteristics of aberrant immunophenotypes in acute lymphoblastic leukaemia (ALL) in children: a multicenter study. Acta Haematol. Pol. 2010*, omówiliśmy temat występowania aberrantnych fenotypów komórek białaczkowych u dzieci, które mogą utrudniać szybką i precyzyjną diagnostykę. Trudności diagnostyczne mogą opóźniać właściwe leczenie, a nawet prowadzić do błędów terapeutycznych. Powyższa praca podsumowała kilkuletnie doświadczenia i naszą wiedzę o fenotypach ostrych białaczek dziecięcych występujących w polskiej populacji.

W efekcie prowadzonych intensywnych badań oraz współpracy wielośrodkowej koordynowanej przez prof. dr. hab. med. Tomasza Szczepańskiego powstała kolejna interesująca publikacja dotycząca fenotypów ostrych białaczek dziecięcych oraz różnic dzielących komórki blastyczne oraz ich prawidłowe odpowiedniki w szpiku kostnym *Ł. Sędek [i in.], Maciej Niedźwiecki. The immunophenotypes of blast cells in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia: how different are they from their normal counterparts? Cytometry B Clin. Cytom. 2014. (MNiSzW=35.000; IF=2,398)*

Uzyskiwane przez Polską Grupę Pediatryczną ds. Leczenia Białaczek i Chłoniaków (PGPLBC) wyniki były wielokrotnie prezentowane na polskich i zagranicznych konferencjach naukowych. Za najważniejsze należy uznać współautorstwo prac omawiających zasady wieloparametrycznej diagnostyki cytometrycznej ostrych białaczek prekursorowych linii B występujących u *dzieci M. Twardoch [i in.] Maciej Niedźwiecki. Multiparameter assessment of immunophenotype of leukemic blasts in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. Clin. Chem. Lab. Med. 2016.*, a także analizujących zjawisko zmiany fenotypu przez komórki białaczkowe w trakcie chemioterapii *M. Twardoch [i in.], Maciej*

Niedźwiecki Monocytic lineage switch in B-cell-precursor acute lymphoblastic leukemia in children: temporary escape or mechanism of chemotherapy resistance? Pediatr. Blood Cancer 2017.

Kolejnym niezwykle ważnym zagadnieniem, którym zajmowałem się w naszym ośrodku było cytometryczne oznaczanie choroby resztkowej w dziecięcym ALL. Oznaczanie MRD przy pomocy cytometru przepływowego przez wiele lat w Polsce stanowiło podstawową metodę diagnostyczną, która pozwalała zakwalifikować dziecko z ALL do odpowiedniej grupy ryzyka i prawidłowo ocenić wczesną odpowiedź na zastosowane leczenie. Dopiero ostatnie lata przyniosły w Polsce uzupełnienie metody cytometrycznej przez techniki genetyczne. Zdobyte doświadczenie w oznaczaniu MRD po 15 i 33 dobie intensywnej chemioterapii znalazło odzwierciedlenie w zaprezentowanym przez nasz zespół doniesieniu zjazdowym T. Szczepanski [i in.], Maciej Niedźwiecki. *Significant prognostic value of minimal residual disease detected by multicolor flow cytometry during induction treatment in children with acute lymphoblastic leukemia. Pediatr. Blood Cancer 2015.* Aktualnie przygotowywana jest do druku kolejna publikacja omawiająca wyniki oznaczania poziomu MRD w naszym ośrodku w odniesieniu do ośrodka referencyjnego w Zabrze, prowadzonego przez prof. dr hab. n.med. Tomasza Szczepańskiego.

Zdobyte doświadczenie w diagnostyce cytometrycznej zaowocowało powołaniem mojej osoby w 2010 roku do zespołu ekspertów Fundacji Wielka Orkiestra Świątecznej Pomocy. Naszym zadaniem był wybór najlepszej oferty przetargowej dotyczącej zakupu cytometrów przepływowych dla polskich ośrodków zajmujących się diagnostyką i leczeniem ostrych białaczek u dzieci.

6.1.2. Ostra białaczka limfoblastyczna (ALL) u dziecka z zespołem Downa.

Analiza wyników leczenia w grupie dzieci chorujących na zespół Downa oraz ostrą białaczkę limfoblastyczną przyniosła ciekawe obserwacje opublikowane w pracy A. Płoszyńska [i in.], Maciej Niedźwiecki *Ostra białaczka u dzieci z zespołem Downa: analiza przypadków własnych. Wiad. Lek. 1998.* W tamtym okresie z piśmiennictwa wynikało, że koincydencja ALL i zespołu Downa u dziecka wiąże się z lepszym ostatecznym efektem terapeutycznym w porównaniu z pacjentami z prawidłowym kariotypem. Niemniej ilość powikłań występujących w trakcie leczenia była większa. Sądono, że wynikało to najprawdopodobniej z częstszego występowania wad wrodzonych w zespole Downa oraz większej wrażliwości komórek na toksyczną chemioterapię.

Znacznie szersza analiza 41 dzieci z tym zespołem przeprowadzona przez J. Zawitkowska i in. obejmująca pacjentów leczonych w latach 2003 -2010 wg. Protokołu ALLIC 2002 w ośrodkach Polskiej Grupy Pediatrycznej ds. Leczenia Białaczek i Chłoniaków tylko częściowo potwierdziła wcześniejsze obserwacje. Wyniki zaprezentowaliśmy w publikacji J. Zawitkowska [i in.], Maciej Niedźwiecki. *Outcome of acute lymphoblastic leukemia in children with down syndrome: Polish pediatric leukemia and lymphoma*

study group report. Pediatr. Hematol. Oncol. 2017. (MNiSzW=15.000; IF=1,154). Z naszych badań wynika, że 5-letni okres przeżycia (OS) był taki sam w obu grupach pacjentów (86% vs 86%, long-rank test, $p = .9$). Czas wolny od wznowy (RFS) obliczono na 73% pacjentów z DS oraz 81% bez tego zespołu w analogicznym okresie leczenia. Nie znaleziono różnic w śmiertelności związanej z terapią. Analizowaliśmy pacjentów leczonych według tych samych schematów terapeutycznych dostosowanych do grupy ryzyka co zwiększa wiarygodność uzyskanych przez nas wyników.

6.2. Chłoniaki nieziarnicze (NHL) u dzieci – wybrane zagadnienia diagnostyki, terapii oraz obserwowanych efektów ubocznych leczenia.

Chłoniaki nieziarnicze stanowią trzecią co do częstości grupę nowotworów występujących u dzieci. Dlatego też wspólnie z dr n. med. Lucyną Maciejką-Kembłowską postanowiliśmy przeanalizować ciężkie powikłania występujące w czasie leczenia oraz ocenić rzadko występujące podtypy chłoniaków. Uzyskane wyniki zaprezentowaliśmy na licznych krajowych i międzynarodowych konferencjach naukowych. Za najważniejsze doniesienia należy uznać:

- L. Maciejka-Kembłowska [i in.], Maciej Niedźwiecki. *Burkitt lymphoma presenting as acute pancreatitis: diagnostic problems with an unusual onset. Pediatr. Blood Cancer 2015*
- L. Maciejka-Kapuścińska [i in.] Maciej Niedźwiecki. *Life-threatening conditions at the moment of diagnosis of non-Hodgkin lymphomas in children. Pediatr. Blood Cancer 2014.*
- L. Maciejka-Kembłowska [i in.], Maciej Niedźwiecki. *Prognosis of rare NHL in children: observations on PTCL of Polish Pediatric Leukemia/Lymphoma Study Group. Br. J. Haematol. 2015.*
- L. Maciejka-Kapuścińska [i in.] Maciej Niedźwiecki. *Peripheral T-cell lymphoma in children, reporting two cases. Br. J. Haematol. 2012.*

6.3. Ostra białaczka mieloblastyczna (AML) u dzieci – wybrane zagadnienia diagnostyki i terapii.

Znacznie rzadszą postacią białaczki u dzieci jest ostry rozrost wywodzący się linii mieloidalnej. Dzięki wielośrodkowej współpracy pod kierunkiem prof. dr hab. med. Walentyny Balwierz systematycznie analizowaliśmy wyniki leczenia uzyskiwane u dzieci chorujących na AML. Wyniki tych badań opublikowaliśmy w 2 publikacjach:

- Dłużniewska [i in.], Maciej Niedźwiecki. *Acute myeloblastic leukemia: Polish Pediatric Leukemia/Lymphoma Study Group Experience of Four Consecutive Unified Treatment Protocols. Onkol. Pol. 2007. (MNiSzW=6.000).*
- Dłużniewska [i in.], Maciej Niedźwiecki. *Niepowodzenia leczenia w ostrej białaczce szpikowej u dzieci: ponad 25-letnie doświadczenia Polskiej Pediatrycznej Grupy ds. Leczenia Białaczek i Chłoniaków. Przegl. Lek. 2010. (MNiSzW=6.000).*

Uzyskane przez nas wyniki potwierdziły znacznie wyższe ryzyko wznowy u dzieci z AML w odniesieniu do pacjentów z ALL. Wiemy również, że w przypadku wznowy AML znacznie częściej

dochodzi do wystąpienia zjawiska chemiooporności, co skutkuje progresją choroby. Dlatego też, aby przełamać to zjawisko stosujemy niezwykle agresywne leczenie niosące ze sobą ryzyko wystąpienia ciężkich powikłań. W celu ich uniknięcia w przypadku niektórych cytostatyków możliwe jest dostosowanie dawki cytostatyku do uzyskanego poziomu terapeutycznego w surowicy. Dzięki współpracy z zespołem prof. dr hab. Tomasza Bączka oraz dr hab. Lucyną Konieczną opracowaliśmy nowatorską metodę oznaczania poziomu topotekanu w surowicy krwi dzieci leczonych z powodu wznowy AML. Dzięki nowej metodzie jesteśmy w stanie kontynuować leczenie dziecka topotekaniem utrzymując optymalny poziom leku w surowicy i minimalizując ryzyko wystąpienia ciężkich powikłań. Z opracowanej przez nas metody korzystają również inne ośrodki hematologiczne w Polsce, wykonując niezbędne oznaczenia w naszym ośrodku. Naszą metodę opisaliśmy w publikacji *T. Bączek [i in.] Maciej Niedźwiecki. Topotecan exposure estimation in pediatric acute myeloid leukemia supported by LC-MS-based drug monitoring and pharmacokinetic analysis. J. Pharm. Biomed. Anal. 2012. (MNiSzW=30.000; IF=2,947)*

6.4. Przewlekła białaczka szpikowa (CML) - wybrane zagadnienia diagnostyki i terapii.

W klinice nadzoruję leczenie i raportowanie wyników terapeutycznych CML u dzieci do ośrodka koordynującego leczenie w Polsce. Dzięki współpracy z prof. dr n.med. Krzysztofem Kałwakiem, koordynatorem krajowym w/w programu, powstała wieloośrodkowa publikacja omawiająca wyniki leczenia dzieci z CML w Polsce. Od momentu wprowadzenia do leczenia imatinibu wyniki terapii są bardzo dobre i zasadniczo pozbawione powikłań, co opisaliśmy w publikacji *M. Janeczko-Czarnecka [i in.], Maciej Niedźwiecki. Imatinib in the treatment of chronic myeloid leukemia in children and adolescents is effective and well tolerated: Report of the Polish Pediatric Study Group for the Treatment of Leukemias and Lymphomas. Adv. Clin. Exp. Med. 2018. (MNiSzW=15.000; IF=1,262)*

6.5. Znaczenie przeszczepiania komórek macierzystych w schorzeniach onkohematologicznych u dzieci.

Prowadząc pacjentów z opornymi na leczenie białaczkami wielokrotnie kwalifikowałem dzieci do zabiegu transplantacji komórek progenitorowych od dawców spokrewnionych i niespokrewnionych. Odbyłem również staż specjalizacyjny na Oddziale Transplantacji Szpiku Kostnego Kliniki Pediatrii, Hematologii i Onkologii Szpitala Uniwersyteckiego w Bydgoszczy. Zebrane doświadczenia oraz dane kliniczne zaowocowały wspólnymi publikacjami dotyczącymi transplantacji komórek hematopoetycznych u dzieci.

- *J.Styczyński, R.Dębski, [i in.], Maciej Niedźwiecki. Transplantacje komórek hematopoetycznych w świetle 5-letnich doświadczeń. Med. Biol. Sci. 2008. (MNiSzW=2.000).*
- *J.Styczyński, R.Dębski, [i in.], Maciej Niedźwiecki. Improvement of cure after hematopoietic stem cell transplantations in children. Med. Biol. Sci. 2016. (MNiSzW=7.000).*

6.6. Guzy lite u dzieci - wybrane zagadnienia diagnostyki, terapii oraz występujących powikłań terapeutycznych.

W trakcie wieloletniej pracy w klinice leczącej guzy lite u dzieci prowadziłem we współpracy z prof. dr hab. n. med. Ewą Bień interesujące badania dotyczące poziomu receptora α IL-2 po leczeniu G-CSF i we wstrząsie septycznym. W tej sytuacji klinicznej podwyższony poziom receptora α IL-2 może fałszywie sugerować wznowę procesu nowotworowego, co zaprezentowaliśmy w pracy E. Bień [i in.], Maciej Niedźwiecki. *G-CSF therapy and catheter-related Gram-positive sepsis increase serum IL-2 receptor α level and may falsely suggest a relapse in children with soft tissue sarcomas unless serum beta2-microglobulin, lactate dehydrogenase and C-reactive protein levels are determined concomitantly.* *Cytokine* 2011. (MNiSzW=25,000; IF=3,019).

W kolejnej pracy E. Bień, [i in.], Maciej Niedźwiecki. *Childhood rhabdomyosarcoma metastatic to bone marrow presenting with disseminated intravascular coagulation and acute tumour lysis syndrome: review of the literature apropos of two cases.* *Clin. Exp. Metastasis* 2010. (MNiSzW=27.000; IF=4,113) opisaliśmy dwa przypadki trudnych diagnostycznie pacjentów leczonych w naszym ośrodku z powodu RMS. W obu przypadkach choroba objawiała się zespołem lizy guza oraz zespołem rozsianego wykrzepiania śródnaczyniowego, co mogło sugerować rozpoznanie choroby rozrostowej układu krwiotwórczego i opóźnić postawienie właściwego rozpoznania

Kolejna opublikowana przeze mnie praca E. Drożyńska, [i in.] Maciej Niedźwiecki. *A correlation of microvascular density and proliferative activity to clinical characteristics in neuroblastoma.* *Neoplasma* 2006. (MNiSzW=10.000; IF=1,247) obejmująca swoją tematyką guzy lite dotyczyła korelacji unaczynienia guza i zdolności proliferacyjnych komórek nowotworowych w neuroblastoma u dzieci.

Natomiast w pracy E. Drożyńska, [i in.] Maciej Niedźwiecki. *Charakterystyka pozaczaskowych złośliwych guzów germinalnych u dzieci w dwóch grupach wiekowych 0-10 lat i 11-18 lat: badania wieloośrodkowe.* *Med. Wieku Rozw.* 2011. (MNiSzW=7.000) podsumowaliśmy dane kliniczne dotyczące dzieci chorujące na nowotwory germinalne w Polsce. Aktualnie przygotowujemy do publikacji kolejną pracę podsumowującą leczenie tej grupy nowotworów w Polsce w okresie 2011-2018.

6.7. Powikłania infekcyjne w okresie intensywnego leczenia chorób nowotworowych u dzieci.

Ważnym problemem, którym zajmowałem się w trakcie pracy na oddziale hematologii dziecięcej były powikłania stosowanej chemio- i radioterapii. Wśród najważniejszych wczesnych powikłań wymienia się zakażenia grzybicze opisane przeze mnie w publikacjach:

- N. Irga [i in.], Maciej Niedźwiecki. *Śmiertelny krwotok płucny w przebiegu aspergilozy u 14-letniej pacjentki z ostrą białaczką mieloblastyczną.* *Mikol. Lek.* 2009.

- *Maciej Niedźwiecki Etiologia, przyczyny i diagnostyka grzybic narządowych u dzieci ze schorzeniami onkohematologicznymi. Opieka Paliat. Dziećmi 2009.*
- *Maciej Niedźwiecki. Ostre krwawienie z drzewa oskrzelowego w przebiegu zakażenia grzybiczego płuc: opis przypadku. Opieka Paliat. Dziećmi 2009.*

Poza grzybicą inwazyjną płuc poważnym problemem terapeutycznym są infekcje wirusowe występujące w okresie neutropenii po chemioterapii. Mogą one prowadzić do ciężkiego uszkodzenia płuc lub w najlepszym wypadku do pogorszenia jakości życia. Problem późnych powikłań po zakażeniu wirusem cytomegalii u dzieci z ALL opisałem w publikacji *E. Wasilewska [i in.], Maciej Niedźwiecki. Lung infection, in particular with cytomegalovirus (CMV) is a risk factor for impairment of lung diffusion capacity in the survivors of childhood haematologic malignancies. Allergy 2018.* Publikacja powstała dzięki mojej współpracy z dr n. med. Elizą Wasilewską zajmującą się zagadnieniami immunologicznymi w grupie dzieci ze schorzeniami onkohematologicznymi. Wspólnie opisaliśmy również interesujący przypadek chłopca leczonego z powodu czerwienicy prawdziwej, który prezentował objawy astmy oskrzelowej na skutek powikłań zakrzepowych w płucach (zatorowość płucna) *E. Wasilewska [i in.], Maciej Niedźwiecki Zespół pseudoastmatyczny spowodowany zatorowością płucną u 14-letniego chłopca z czerwienicą prawdziwą. Alerg. Astma Immunol. 2007. (MNiSzW=6.000).* Aktualnie zgłoszone zostały przez nas do publikacji 2 kolejne wspólne prace:

- *E. Wasilewska, K. Kuziemski, M. Niedoszytko, B. Kaczorowska-Hać, M. Niedźwiecki, S. Małgorzewicz, E. Jassen: Impairment of lung diffusion capacity – new consequences in the long-term childhood leukemia survivors. Journal of Cancer Survivorship.*
- *E. Wasilewska, K. Kuziemski, M. Niedoszytko, B. Kaczorowska-Hać, M. Niedźwiecki, S. Małgorzewicz, E. Jassen. Risk factors and clinical manifestation for impairment of lung diffusion capacity in the childhood leukemia survivors. Annals of Hematology.*

Kolejnym ważnym i dotychczas nieuniknionym powikłaniem jest hemosyderoza rozwijająca się na skutek częstych przetoczeń masy erytrocytarnej. Interesujące 2 przypadki zaprezentowałem w doniesieniu zjazdowym *Kaczorowska-Hać [i in.], Maciej Niedźwiecki. Iron overload in two children after allogeneic hematopoietic SCT with concomitant HFE p.s65c gene mutation. J. Blood Lymph 2014.*

6.8. Endokrynologia i diabetologia dziecięca – zaburzenia wzrastania, wybrane aspekty diagnostyki i leczenia dzieci z cukrzycą.

Na początku mojej kariery zawodowej w Klinice Pediatrii, Hematologii, Onkologii i Endokrynologii GUMED zajmowałem się również dziećmi ze schorzeniami endokrynologicznego m.in. cukrzycą, nadwagą oraz somatotropinową niewydolnością przysadki. Na prośbę głównych badaczy

dokonałem opracowania bazy danych pacjentów oraz wykonałem szczegółową analizę statystyczną. Nasza współpraca zaowocowała następującymi publikacjami w polskich i zagranicznych czasopismach:

- *M. Korpala-Szczyrska [i in.], Maciej Niedźwiecki. Ocena wzrostu końcowego pacjentów z somatotropinową niedoczynnością przysadki, leczonych hormonem wzrostu. Endokryinol. Diabetol. Chor. Przem. Mat. Wiek Rozw. 2006; (MNiSzW=3.000)*
- *M. Pawłowicz [i in.] Maciej Niedźwiecki. Difficulties or mistakes in diagnosing type 1 diabetes mellitus in children? The consequences of delayed diagnosis. Endokryinol. Diabetol. Chor. Przem. Mat. Wiek Rozw. 2008.*
- *M. Pawłowicz [i in.] Maciej Niedźwiecki. Difficulties or mistakes in diagnosing type 1 diabetes in children?: demographic factors influencing delayed diagnosis. Pediatr. Diabet. 2009. (MNiSzW=32.000; IF=2,628)*
- *A. Stefanowicz [i in.] Maciej Niedźwiecki. Obesity and overweight: current health problems of childhood. Endokryinol. Otyłość Zab. Przem. Mat. 2009.*
- *A. Stefanowicz [i in.] Maciej Niedźwiecki. Analysis of the impact of environmental and social factors, with a particular emphasis on education, on the level of metabolic control in type 1 diabetes in children. Endokryinol. Pol. 2012.*

Kontynuując moje badania dotyczące poziomu aminokwasów w kondensatach wydychanego powietrza i dysponując bardzo obiecującą naukowo metodą oceny substancji biologicznie czynnych w płynach fizjologicznych nawiązałem współpracę z prof. dr hab. med. Małgorzata Myśliwiec z Katedry i Kliniki Pediatrii, Diabetologii i Endokrynologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego. Wspólnie postanowiliśmy wykonać analogiczne oznaczenia w grupie dzieci z cukrzycą na różnych etapach leczenia. Aktualnie trwa gromadzenie materiału do zaplanowanych wcześniej badań, przy czym analizie zostaną także inne substancje biologicznie czynne w kondensatach wydychanego powietrza.

7. Aktualnie prowadzona współpraca naukowa z innymi zespołami badawczymi oraz planowany rozwój badań w przyszłości.

7.1. Projekt 1: Kombinacje substancji biologicznie aktywnych pochodzenia roślinnego jako nowa strategia farmakoterapeutyczna w ostrych białaczkach limfoblastycznych u dzieci.

W chwili obecnej współpracuję z kilkoma zespołami badawczymi. Tematy naszych projektów obejmują różne aspekty diagnostyki i terapii chorób rozrostowych u dzieci. Zespół złożony z dr Natalii Miękus-Purwin oraz prof. Tomasza Bączka z Katedry Chemii Farmaceutycznej, a także dr hab. Patrycji Koszałki i dr Grzegorza Stasiłój z Katedry Biotechnologii Medycznej wraz ze mną aktualnie pracuje nad projektem wynalezienia kombinacji substancji biologicznych pochodzenia roślinnego o potencjale przeciwnowotworowym. Uzyskane dotychczas wyniki są bardzo obiecujące i dają nadzieję na wynalezienie kombinacji 4 biologicznie aktywnych związków wspierających klasyczną chemioterapię w leczeniu ALL.

u dzieci. Aktualnie przeprowadzana jest szczegółowa analiza statystyczna uzyskanych wyników w celu opublikowania ich w renomowanym czasopiśmie.

Fundusze niezbędne do przeprowadzenia tego projektu pozyskałem z Fundacji GetResponse Cares w kwocie 96 500 PLN.

7.2. Projekt 2: Białka szoku termicznego (HSP) w ALL u dzieci.

Jednym z najciekawszych naukowo projektów jest poszukiwanie korelacji białek szoku termicznego (HSP) z wybranymi parametrami immunologicznymi, czynnikami ryzyka ALL, cechami biologicznymi blastów białaczkowych oraz wczesną i późną odpowiedzią na leczenie. Badania prowadzę wspólnie z prof. dr hab. n.med. Michałem Woźniakiem, lek. Dorotą Pawlik-Gwozdecką oraz dr hab. Magdaleną Górską-Ponikowską z Katedry i Zakładu Chemii Medycznej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego.

W ramach projektu „Ocena rekonstrukcji immunologicznej ze szczególnym uwzględnieniem komórek dendrytycznych oraz ich związku z obecnością zewnątrzkomórkowych białek szoku termicznego w trakcie intensywnej chemioterapii u dzieci leczonych z powodu ostrej białaczki limfoblastycznej” pozyskałem kwotę 43 789 PLN z Fundacji GetResponse Cares na w/w badania.

Do chwili obecnej zostało opublikowanych kilka prac omawiających tematyczne HSP, w tym *D. Skóra, [i in.] Maciej Niedźwiecki. Białka szoku termicznego HSPs: potencjalne markery diagnostyczne oraz cel terapeutyczny leków antynowotworowych nowej generacji. Na pograniczu chemii i biologii. T. 32 / pod red. H. Koroniaka i J. Barciszewskiego/.*

Uzyskane dotychczas wyniki badań wstępnie potwierdzają tezę o istotnym statystycznie znaczeniu białek szoku termicznego w diagnostyce i monitorowaniu ALL u dzieci. Uważam, że nasze badania mogą przyczynić się również do opracowania nowych strategii terapeutycznych oraz opracowania nowych leków celowanych.

W chwili obecnej prowadzimy szczegółową analizę statystyczną wyników uzyskanych w naszym projekcie w celu ich opublikowania w renomowanych czasopismach naukowych. Korelacja białek HSP z wybranymi cechami biologicznymi ALL u dzieci będzie tematem rozprawy doktorskiej lek. Doroty Pawlik-Gwozdeckiej.

7.3. Projekt 3: Mutacja genu TP53 w hipodiploidalnej ALL u dzieci.

Projekt prowadzę wspólnie z lek. Oskarem Budziło we współpracy z prof. dr hab. med. Wojciechem Młynarskim z Kliniki Pediatrii, Onkologii, Hematologii i Diabetologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

oraz prof. dr hab. n.med. Bartoszem Wasągim z Katedry i Zakładu Biologii i Genetyki Medycznej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego.

Badania obejmują grupę dzieci z ALL oraz hipodiploidalnym kariotypem w komórkach blastycznych, u których wykonano rutynową diagnostykę genetyczną w Laboratorium Genetyki Klinicznej UCK w Gdańsku oraz Laboratorium ONCOLAB w Łodzi. Grupa ta cechuje się skrajnie złym rokowaniem związanym zwykle z obecną mutacją genu TP53. W kolejnym etapie dzieci, u których wykryjemy mutacje TP53 będą miały wykonane sekwencjonowanie następnej generacji genów kodujących białko p53 w ośrodku gdańskim. Uzyskane wyniki będą tematem rozprawy doktorskiej lek. Oskara Budziło.

7.4. Projekt 4: Poszukiwanie nowych markerów biochemicznych oraz immunologicznych w ostrych białaczkach dziecięcych.

W ramach współpracy z prof. dr hab. med. Piotrem Trzonkowskim oraz dr n.med. Maciejem Zielińskim z Katedry i Zakładu Immunologii Medycznej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, a także prof. dr hab. Tomaszem Bączkiem oraz dr hab. Lucyną Konieczną z Zakładu Chemii Farmaceutycznej postanowiłem ocenić poziomy wybranych interleukin oraz profili aminokwasowo-białkowo-peptydowych w płynach ustrojowych dzieci chorujących na ALL. Szczególnie interesująca jest możliwość wykrycia zmian infekcyjnych oraz naciekowych w centralnym układzie nerwowym poprzez oznaczanie tych parametrów w PMR. W tym celu pozyskałem dofinansowanie projektu „Ocena wybranych parametrów układu odpornościowego (IL- 2, IL- 6, IL-16 i NSE) oraz profili aminokwasowo-białkowo-peptydowych w płynie mózgowo- rdzeniowym, krwi obwodowej, szpiku kostnym oraz moczu dzieci chorujących na ostre białaczki” w kwocie 22 300 PLN z Fundacji GetResponse Cares.

Aktualnie zebraliśmy materiał badawczy od pacjentów, skompletowaliśmy odczynniki i w najbliższym czasie dokonamy oznaczeń laboratoryjnych interesujących nas parametrów.

7.5. Projekt 5: Pierwotne i wtórne niedobory immunologiczne oraz choroby z autoagresji.

Aktualnie pełnię obowiązki Z-cy Ordynatora w Klinice i prowadzę Oddział Szybkiej Diagnostyki z Oddziałem Dziennym, na którym hospitalizowane są dzieci z chorobami onkologicznymi, hematologicznymi, immunologicznymi, metabolicznymi i genetycznymi. Jesteśmy jedynym ośrodkiem w województwie prowadzącym podaż immunoglobulin dzieciom z wrodzonymi niedoborami immunologicznymi.

W dniu 12.11.2018 r. otworzyłem specjalizację z immunologii klinicznej, co jest naturalną konsekwencją moich zainteresowań naukowych. W najbliższych latach chciałbym kontynuować badania z dziedziny immunologii nowotworów oraz immunoterapii. Jednym z tematów, którym zajmuję się wspólnie z dr n. med. Magdaleną Małanowską oraz dr n. med. Elżą Wasilewską jest ocena regeneracji układu

immunologicznego po zakończonej chemioterapii. W tym celu zbieramy materiał do analizy wykonując niezbędne oznaczenia wybranych parametrów układu immunologicznego u dzieci zgłaszających się na rutynową kontrolę po leczeniu chemicznym na prowadzonym przeze mnie oddziale.

W ostatnich latach nawiązałem interesującą współpracę z grupą badawczą z Hiszpanii, która zajmuje się leczeniem chorób z autoagresji oraz tworzeniem rejestru dzieci z katastroficzną postacią zespołu antyfosfolipidowego (CAPS). CAPS jest niezwykle rzadką postacią APS i charakteryzuje się skrajnie ciężkim przebiegiem klinicznym oraz wysoką śmiertelnością. Efektem naszej współpracy jest opublikowana w renomowanym czasopiśmie analiza omawiająca szczegółowo pacjentów zarejestrowanych w „CAPS Registry”. Zgodnie z moją wiedzą jest to pierwsza praca omawiająca tak liczną grupę dzieci z CAPS – *Berman et al., Maciej Niedźwiecki. Pediatric catastrophic antiphospholipid syndrome: descriptive analysis of 45 patients from the CAPS Registry. Autoimmun. Rev. 2014.*

8. Działalność pozanaukowa, społeczna i organizacyjna.

8.1. Działalność w zawodzie lekarza.

Posiadam tytuł specjalisty z zakresu pediatrii, specjalisty onkologa i hematologa dziecięcego, a także rozpoczętą specjalizację z dziedziny immunologii klinicznej (2018 – 2020). Jako pracownik Kliniki Pediatrii, Hematologii i Onkologii UCK/GUMed udzielam świadczeń zdrowotnych dla pacjentów tego szpitala. Od wielu lat prowadzę również działalność leczniczą na rzecz Szpitala Rehabilitacyjnego „Orlik” w Kudowie-Zdrój dla dzieci z rozpoznaniem choroby nowotworowej będących w okresie pełnej remisji choroby oraz pacjentów z przewlekłymi schorzeniami hematologicznymi: hemofilie i inne skazy krwotoczne, niedokrwistości przewlekłe (aplastyczne i immunologiczne).

8.2. Fundacja Pomorskie Hospicjum dla Dzieci.

Jestem współzałożycielem i aktualnym Przewodniczącym Rady Fundacji Pomorskie Hospicjum dla Dzieci, które powstało w roku 2008. Pełnię również obowiązki Kierownika Medycznego Fundacji PHD. Podopiecznymi Fundacji jest aktualnie 43 śmiertelnie chorych dzieci, natomiast pod moją bezpośrednią opieką jest 13 śmiertelnie chorych pacjentów.

Z ruchem hospicyjnym związany jestem już od 21 lat, początkowo jako wolontariusz, a następnie jako lekarz pacjentów dorosłych i dzieci. Początkowo pracowałem w Hospicjum Pallotinum, które w okresie późniejszym zmieniło nazwę na Hospicjum im. Ks. E. Dutkiewicza. W tym okresie sprawowałem opiekę nad dorosłymi pacjentami hospicjum domowego i stacjonarnego. Dopiero po kilku latach skupiłem

się na opiece paliatywnej nad dziećmi. Nawiązałem współpracę z dr hab. n.med. Tomaszem Danglem z Fundacji Warszawskie Hospicjum dla Dzieci (WHD) i dzięki finansowemu i merytorycznemu wsparciu WHD otworzyłem w Gdańsku pierwsze samodzielne domowe hospicjum dziecięce, którym kieruję do dzisiaj. Poza dyżurami lekarskimi w hospicjum oraz opieką medyczną nad podopiecznymi fundacji do moich obowiązków służbowych należy również pozyskiwanie środków finansowych niezbędnych do funkcjonowania hospicjum. W tym celu organizuję corocznie mecze i turnieje charytatywne, koncerty, biegi charytatywne oraz liczne imprezy mające na celu pozyskanie nowych darczyńców dla Fundacji. Zajmuję się również nadzorowaniem pracy personelu hospicjum, w tym prowadzenia dokumentacji medycznej, a także wspólnie z Prezesem Fundacji kontraktowaniem świadczeń medycznych w NFZ.

Zdobyte doświadczenie wykorzystuję organizując konferencje tematyczne oraz wygłaszając wykłady z opieki paliatywnej nad dziećmi dla studentów medycyny oraz młodych lekarzy.

Jako członek Rady Ogólnopolskiego Forum Pediatrycznej Opieki Paliatywnej uczestniczę w negocjacjach z Ministerstwem Zdrowia oraz Narodowym Funduszem Zdrowia dotyczących kształtu opieki paliatywnej nad dziećmi w Polsce.

Za swoją działalność hospicyjną byłem wielokrotnie nagradzany, m.in. Krzyżem Kawalerskim Orderu Odrodzenia Polski przez Prezydenta Rzeczypospolitej śp. Lecha Kaczyńskiego, Tytułem Laureata konkursu Profesjonalisci Forbsa w kategorii Lekarz, czy też nagrodą im. Aleksandry Gabrysiak za działalność na rzecz gdańskiego hospicjum.

9. Funkcje organizacyjne i społeczne pełnione na rzecz Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego i poza nim.

9.1. Działalność społeczna;

- Członek Komisji ds. Kultury, Sportu i Rekreacji Okręgowej Izby Lekarskiej w Gdańsku kadencji 2013 – 2019 r. (nadal)
- Przewodniczący Rady Fundacji Pomorskie Hospicjum dla Dzieci od 2008 r. (nadal)
- Członek Zarządu Fundacji GetResponse Cares od 2016 r. (nadal)
- Członek Rady Ogólnopolskiego Forum Pediatrycznej Opieki Paliatywnej od 09.2019 r. (nadal)

9.2. *Osiągnięcia sportowe;*

Wielokrotnie reprezentowałem Gdański Uniwersytet Medyczny na arenie międzynarodowej i krajowej w Mistrzostwach Polski Uniwersytetów Medycznych oraz Mistrzostwach Świata Lekarzy „Medigames” w judo i piłce nożnej. Dla macierzystej uczelni zdobywałem wielokrotnie złote, srebrne i brązowe medale w w/w imprezach sportowych. Za co otrzymywałem wyróżnienia od Rektora Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego oraz Okręgowej Izby Lekarskiej (OIL) w Gdańsku. Za zasługi dla rozwoju judo w Polsce otrzymałem Srebrną Odznakę od Polskiego Związku Judo.

9.3. *Działalność na rzecz rozwoju bazy naukowej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego.*

Celem mojej działalności organizacyjnej na rzecz Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego było nawiązanie współpracy naukowej z liczącymi się w świecie nauki ośrodkami badawczymi. W tym celu pozyskałem środki finansowe na poprawę bazy sprzętowej współpracujących ze mną wybranych jednostek naukowych. Ze środków Fundacji GetResponse Cares zakupiliśmy aparaturę naukową dla następujących jednostek GUMED:

- Klinika Pediatrii, Hematologii i Onkologii GUMED – kamera cyfrowa z oprogramowaniem, torem wizyjnym, komputerem i oprogramowaniem jako doposażenie mikroskopu do oceny szpiku kostnego oraz krwi obwodowej dzieci z białaczkami (wartość 21 653 PLN.)
- Katedra Chemii Medycznej GUMED – Inkubator z atmosferą CO₂, komora laminarna, wirówka, mikroskop, odczynniki i aparatura pomocnicza (wartość 117 647,48 PLN).
- Katedra Chemii Farmaceutycznej - aparat do pobierania kondensatów powietrza wydychanego Jaeger EcoScreen Version 1.0 oraz sprzęt uzupełniający – koszt ok. 80 000 PLN.

10. *Bibliography:*

1. Pui CH, Mullighan CG, Evans WE, Relling MV. Pediatric acute lymphoblastic leukemia: where are we going and how do we get there? *Blood*. 2012;120(6):1165-1174.
2. Mullighan CG, Su X, Zhang J, et al. Deletion of IKZF1 and prognosis in acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med*. 2009;360(5):470-480.
3. Coustan-Smith E, Mullighan CG, Onciu M, et al. Early T-cell precursor leukaemia: a subtype of very high-risk acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet Oncol*. 2009;10(2):147-156.
4. Chen IM, Harvey RC, Mullighan CG, et al. Outcome modeling with CRLF2, IKZF1, JAK, and minimal residual disease in pediatric acute lymphoblastic leukemia: a Children's Oncology Group study. *Blood*. 2012;119(15):3512-3522.
5. Schultz KR, Carroll A, Heerema NA, et al. Long-term follow-up of imatinib in pediatric Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia: Children's Oncology Group study AALL0031. *Leukemia*. 2014;28(7):1467-1471.
6. Mullighan CG, Zhang J, Harvey RC, et al. JAK mutations in high-risk childhood acute lymphoblastic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(23):9414-9418.
7. Farhadfar N, Litzow MR. New monoclonal antibodies for the treatment of acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Res*. 2016;49:13-21.

8. Ceppi F, Weitzman S, Woessmann W, et al. Safety and efficacy of intrathecal rituximab in children with B cell lymphoid CD20+ malignancies: An international retrospective study. *Am J Hematol.* 2016;91(5):486-491.
9. Silverstein FS, Hutchinson RJ, Johnston MV. Cerebrospinal fluid biogenic amine metabolites in children during treatment for acute lymphocytic leukemia. *Pediatr Res.* 1986;20(4):285-291.
10. Bourcier S, Benoist JF, Clerc F, Rigal O, Taghi M, Hoppilliard Y. Detection of 28 neurotransmitters and related compounds in biological fluids by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2006;20(9):1405-1421.
11. Weismann D, Peitzsch M, Raida A, et al. Measurements of plasma metanephrines by immunoassay vs liquid chromatography with tandem mass spectrometry for diagnosis of pheochromocytoma. *Eur J Endocrinol.* 2015;172(3):251-260.
12. Ippolito JE. Current concepts in neuroendocrine cancer metabolism. *Pituitary.* 2006;9(3):193-202.
13. Marc DT, Ailts JW, Campeau DC, Bull MJ, Olson KL. Neurotransmitters excreted in the urine as biomarkers of nervous system activity: validity and clinical applicability. *Neurosci Biobehav Rev.* 2011;35(3):635-644.
14. Vimal A, Kumar A. L-Asparaginase: a feasible therapeutic molecule for multiple diseases. *3 Biotech.* 2018;8(6):278.
15. Maude SL, Frey N, Shaw PA, et al. Chimeric antigen receptor T cells for sustained remissions in leukemia. *N Engl J Med.* 2014;371(16):1507-1517.
16. Idris SZ, Hassan N, Lee LJ, et al. Increased regulatory T cells in acute lymphoblastic leukaemia patients. *Hematology.* 2016;21(4):206-212.
17. Terwilliger T, Abdul-Hay M. Acute lymphoblastic leukemia: a comprehensive review and 2017 update. *Blood Cancer J.* 2017;7(6):e577.
18. Schrappe M, Valsecchi MG, Bartram CR, et al. Late MRD response determines relapse risk overall and in subsets of childhood T-cell ALL: results of the AIEOP-BFM-ALL 2000 study. *Blood.* 2011;118(8):2077-2084.
19. Wu CP, Qing X, Wu CY, Zhu H, Zhou HY. Immunophenotype and increased presence of CD4(+)CD25(+) regulatory T cells in patients with acute lymphoblastic leukemia. *Oncol Lett.* 2012;3(2):421-424.
20. Curiel TJ. Regulatory T cells and treatment of cancer. *Curr Opin Immunol.* 2008;20(2):241-246.
21. Piersma SJ, Welters MJ, van der Burg SH. Tumor-specific regulatory T cells in cancer patients. *Hum Immunol.* 2008;69(4-5):241-249.
22. Chaudhary B, Elkord E. Regulatory T Cells in the Tumor Microenvironment and Cancer Progression: Role and Therapeutic Targeting. *Vaccines (Basel).* 2016;4(3).
23. Mougiakakos D, Choudhury A, Lladser A, Kiessling R, Johansson CC. Regulatory T cells in cancer. *Adv Cancer Res.* 2010;107:57-117.
24. Josefowicz SZ, Lu LF, Rudensky AY. Regulatory T cells: mechanisms of differentiation and function. *Annu Rev Immunol.* 2012;30:531-564.
25. Wang XJ, Leveson-Gower D, Golab K, et al. Influence of pharmacological immunomodulatory agents on CD4(+)CD25(high)FoxP3(+) T regulatory cells in humans. *Int Immunopharmacol.* 2013;16(3):364-370.
26. Lustfeld I, Altvater B, Ahlmann M, et al. High proportions of CD4⁺ T cells among residual bone marrow T cells in childhood acute lymphoblastic leukemia are associated with favorable early responses. *Acta Haematol.* 2014;131(1):28-36.
27. SALEM ML, Abdou S, El-Shanshory M, et al. Increases in the numbers of cells with the phenotype of myeloid-derived suppressor and regulatory T cells in children with acute lymphoblastic leukemia. *The Journal of Immunology.* 2016;196(1 Supplement):211.211-211.211.
28. Wu ZL, Hu GY, Chen FX, et al. [Change of CD4(+) CD25(+) regulatory T cells and NK Cells in peripheral blood of children with acute leukemia and its possible significance in tumor immunity]. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi.* 2010;18(3):709-713.
29. Jarnicki AG, Lysaght J, Todryk S, Mills KH. Suppression of antitumor immunity by IL-10 and TGF-beta-producing T cells infiltrating the growing tumor: influence of tumor environment on the induction of CD4⁺ and CD8⁺ regulatory T cells. *J Immunol.* 2006;177(2):896-904.
30. Bhattacharya K, Chandra S, Mandal C. Critical stoichiometric ratio of CD4(+) CD25(+) FoxP3(+) regulatory T cells and CD4(+) CD25(-) responder T cells influence immunosuppression in patients with B-cell acute lymphoblastic leukaemia. *Immunology.* 2014;142(1):124-139.
31. Ahmadzadeh M, Rosenberg SA. IL-2 administration increases CD4⁺ CD25(hi) Foxp3⁺ regulatory T cells in cancer patients. *Blood.* 2006;107(6):2409-2414.

32. Li AH, Qiu GQ, Gu WY, et al. [Expression of CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells in the patients with acute lymphocytic leukemia]. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi*. 2007;23(5):439-442.
33. D'Arena G, Laurenti L, Minervini MM, et al. Regulatory T-cell number is increased in chronic lymphocytic leukemia patients and correlates with progressive disease. *Leuk Res*. 2011;35(3):363-368.
34. Szczepanski MJ, Szajnik M, Czystowska M, et al. Increased frequency and suppression by regulatory T cells in patients with acute myelogenous leukemia. *Clin Cancer Res*. 2009;15(10):3325-3332.
35. Shenghui Z, Yixiang H, Jianbo W, et al. Elevated frequencies of CD4⁺ CD25⁺ CD127^{lo} regulatory T cells is associated to poor prognosis in patients with acute myeloid leukemia. *Int J Cancer*. 2011;129(6):1373-1381.

Gdańsk. 10.03.2019 r.

Dr n.med. Maciej Niedzwiecki

