

Autoreferat

Grzegorz Rymkiewicz
Pracownia Cytometrii Przepływowej
Zakładu Patologii i Diagnostyki Laboratoryjnej
Centrum Onkologii-Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie w Warszawie

Ubiegający się o nadanie stopnia doktora habilitowanego.

1. Dane osobowe

Imię i nazwisko: Grzegorz Rymkiewicz

Obecne stanowisko: Adiunkt, Kierownik Pracowni Cytometrii Przepływowej

Adres służbowy

Pracownia Cytometrii Przepływowej, Zakład Patologii i Diagnostyki Laboratoryjnej
Centrum Onkologii–Instytut im. Marii Skłodowskiej–Curie w Warszawie,
Ul. Roentgena 5

2. Wykształcenie, posiadane dyplomy, stopnie naukowe

1987–1993, Studia na Wydziale Lekarskim Akademii Medycznej w Poznaniu (1987-1989) i na I Wydziale Lekarskim Akademii Medycznej w Warszawie (1989-1993),

1989 – 1990, Fakultet z zakresu Biologii Molekularnej na Uniwersytecie Warszawskim,

1993, Dyplom lekarza, Akademia Medyczna w Warszawie, I Wydział Lekarski,

1994, Rozpoczęcie pracy w Centrum Onkologii-Instytucie w Zakładzie Patologii przy ul. Wawelskiej, Warszawa,

1995, Trzy miesięczny staż w Karolinska Institutet, Sztokholm w Zakładzie Hematopatologii, Kierownik Prof. Anna Porwit-MacDonald,

1996, I stopień specjalizacji z patomorfologii (opiekun, Prof. Włodzimierz Olszewski),

2000, II stopień specjalizacji z patomorfologii (opiekun, Prof. Olga Mioduszevska),

2007, Obrona pracy doktorskiej (summa cum laudae):

Tytuł rozprawy „Porównanie badań histopatologicznych i cytometrii przepływowej w diagnostyce chłoniaka z komórek płaszcz”,

Centrum Onkologii - Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie w Warszawie,

Data obrony: 02-10-2007,

Promotor pracy: Prof. dr hab. n. med. Jan Walewski

Recenzenci: Prof. dr hab. n. med. Jadwiga Dwilewicz-Trojaczek

Prof. dr hab. n. med. Czesław Radzikowski

Stopień nadany przez Radę Naukową Centrum Onkologii – Instytutu im. Marii Skłodowskiej-Curie w Warszawie, ul. W.K. Roentgena 5, 02-781 Warszawa

3. Przebieg pracy zawodowej

1993–1994, staż podyplomowy w Wojewódzkim Szpitalu w Bydgoszczy oraz w Regionalnym Centrum Onkologii w Bydgoszczy,

1994–2000, młodszy asystent w Zakładzie Patologii, Centrum Onkologii-Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie przy ul Wawelskiej w Warszawie,

2000–2007, starszy asystent w Zakładzie Patologii, Centrum Onkologii-Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie przy ul Roentgena w Warszawie,

2007 do chwili obecnej – adiunkt w Zakładzie Patologii (obecnie Zakład Patologii i Diagnostyki Laboratoryjnej) Centrum Onkologii-Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie i kierownik Pracowni Cytometrii Przepływowej,

2000–2015, asystent w Zakładzie Cytologii, Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego w Warszawie,

2013 do chwili obecnej – stanowisko diagnostyczne w Zakładzie Patomorfologii Szpitala MSW i A w Warszawie.

4. Wskazane osiągnięcie wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2016 r. poz. 882 ze zm. w Dz. U. z 2016 r. poz. 1311.): cykl jednotematycznych publikacji pod tytułem:

A) Charakterystyka kliniczno-patologiczna i molekularna *MYC*-negative ‘Burkitt-like lymphoma with 11q aberration’ (BLL,11q), nowej tymczasowej jednostki nozologicznej (WHO 2017); autorski algorytm diagnostyczny oparty o cytometrię przepływową, umożliwiający rozpoznanie BLL,11q w 1,5 godziny od wykonania biopsji cienkoigłowej.

Sumaryczny współczynnik wpływu (IF, impact factor) wymienionych pierwszych 6 publikacji (zgodny z rokiem opublikowania) wynosi: **39,718**. Sumaryczna liczba punktów MNiSW (zgodnie z rokiem opublikowania) dla wymienionych publikacji wynosi **230**.

B) Publikacje wchodzące w skład „Osiągnięcia Naukowego”:

- 1) Pienkowska-Grela B, **Rymkiewicz G**, Grygalewicz B, Woroniecka R, Krawczyk P, Czyż-Domanska K, Walewski J (2011). Partial trisomy 11, dup(11)(q23q13), as a defect

characterizing lymphomas with Burkitt pathomorphology without *MYC* gene rearrangement. *Med Oncol* 2011;28(4):1589-1595. (IF: 2,140; pkt MNiSW: 20; liczba cytowań: 25); **praca oryginalna. Udział własny szacuję na 40%** (obejmuje pobranie świeżego materiału diagnostycznego do badań cytometryczno-cytogenetyczno-molekularnych, wysłanie go na badania cytogenetyczne ze wstępnym rozpoznaniem chłoniaka Burkitta, ocena histopatologiczno-cytometryczna przypadków, interpretacja wyników kliniczno-histopatologiczno-cytometrycznych w kontekście powtarzalnych cech cytogenetycznych u 4 chorych na 78 przeanalizowanych chłoniaków Burkitta oraz udział w pisaniu manuskryptu, zarówno części dotyczącej rutynowej diagnostyki patomorfologicznej (tabela 1) jak i genetycznej.

- 2) Salaverria I, Martin-Guerrero I, Wagener R, Kreuz M, Kohler CW, Richter J, Pienkowska-Grela B, Adam P, Burkhardt B, Claviez A, Damm-Welk C, Drexler HG, Hummel M, Jaffe ES, Küppers R, Lefebvre C, Lisfeld J, Löffler M, Macleod RA, Nagel I, Oschlies I, Rosolowski M, Russell RB, **Rymkiewicz G**, Schindler D, Schlesner M, Scholtysik R, Schwaenen C, Spang R, Szczepanowski M, Trümper L, Vater I, Wessendorf S, Klapper W, Siebert R (2014); Molecular Mechanisms in Malignant Lymphoma Network Project; Berlin-Frankfurt-Münster Non-Hodgkin Lymphoma Group. A recurrent 11q aberration pattern characterizes a subset of *MYC*-negative high-grade B-cell lymphomas resembling Burkitt lymphoma. *Blood* 2014;123(8):1187-1198. (IF: 10,452; pkt MNiSW: 50; liczba cytowań: 79); **praca oryginalna. Udział własny szacuję na 6%** (obejmuje przekazanie 4 wyselekcjonowanych materiałów diagnostycznych (bloczków parafinowych) wraz z obrazem histopatologicznym i immunohistochemicznym oraz pełnych danych klinicznych związanych z przebiegiem leczenia, udział w pisaniu manuskryptu (tabela 1, tabela 2, figura 3). Materiały z bloczków parafinowych zdiagnozowałem jako chłoniaki Burkitta bez rearanżacji *MYC*, ale ze zmianą na długim ramieniu chromosomu 11 (obecnie BLL,11q).
- 3) Zajdel M,* **Rymkiewicz G**,* Chechlinska M, Blachnio K, Pienkowska-Grela B, Grygalewicz B, Goryca K, Cieslikowska M, Bystydziński Z, Swoboda P, Walewski J, Siwicki JK (2015). miR expression in *MYC*-negative DLBCL/BL with partial trisomy 11 is similar to classical Burkitt lymphoma and different from diffuse large B-cell lymphoma. *Tumour Biol* 2015;36:5377-5388. (IF: 2,926; pkt MNiSW: 30; liczba cytowań: 10); **praca oryginalna. Udział własny szacuję na 45%** (* dwóch pierwszych autorów z takim samym udziałem w pisaniu manuskryptu) obejmuje pobranie i biobankowanie świeżego materiału diagnostycznego do badań cytometryczno-cytogenetyczno-molekularnych od 102 chorych z

bardzo agresywnymi chłoniakami B-komórkowymi, wysłanie go na badania cytogenetyczno-molekularne, diagnostyka histopatologiczno-cytometryczno-cytogenetyczno-molekularna w/w przypadków, interpretacji wyników kliniczno-histopatologiczno-cytometryczno-molekularnych w kontekście badanych poziomów mikroRNA, znaczący udział w powstawaniu i w pisaniu manuskryptu (przygotowanie tabel: tabela 1, tabela 2, tabela 3, tabela 4, tabela 5, tabela 6, tabela 7), zebraniu piśmiennictwa oraz odpowiedzi na recenzje, korekta pracy przed złożeniem do druku).

- 4) Grygalewicz B, Woroniecka R, **Rymkiewicz G**, Rygier J, Borkowska K, Kotyl A, Blachnio K, Bystydziński Z, Nowakowska B, Pienkowska-Grela B (2017). The 11q-gain/loss aberration occurs recurrently in *MYC*-negative Burkitt-like lymphoma with 11 q aberration as well as *MYC*-positive Burkitt lymphoma and *MYC*-positive high grade B-cell lymphoma, NOS. *Am J Clin Pathol* 2017;149(1):17-28. **(IF: 2,413; pkt MNiSW: 35; liczba cytowań: 3); praca oryginalna. Udział własny szacuję na 30%** (obejmuje pobranie świeżego materiału diagnostycznego do badań cytometryczno-cytogenetyczno-molekularnych od nowych 11 chorych z bardzo agresywnymi chłoniakami B-komórkowymi - przypominającymi chłoniaka Burkitta, z powtarzalną zmianą cytogenetyczno-molekularną obejmującą ramię długie chromosomu 11. W/w aberację cytogenetyczną stwierdzono w BLL,11q, chłoniaku Burkitta (BL), w agresywnych chłoniakach z komórek B (HGBL). Ponadto, mój udział obejmował diagnostykę histopatologiczno-cytometryczno-cytogenetyczną w/w przypadków, dane kliniczne i ocenę korelację obrazu klinicznego choroby oraz wielkości guza z amplifikacją regionu obejmującego gen *KMT2A*, udział w powstawaniu i w pisaniu manuskryptu (tabela 1, Image 1), odpowiedzi na recenzje, korekta pracy przed złożeniem do druku).
- 5) **Rymkiewicz G**, Grygalewicz B, Chechlińska M, Blachnio K, Bystydziński Z, Romejko-Jarosinska J, Woroniecka R, Zajdel M, Domanska-Czyz K, Martin-Garcia D, Nadeu F, Swoboda P, Rygier J, Pienkowska-Grela B, Siwicki JK, Prochorec-Sobieszek M, Salaverria I, Siebert R, Walewski J (2018). A comprehensive flow-cytometry-based immunophenotypic characterization of Burkitt-like lymphoma with 11q aberration. *Mod Pathol* 2018;31(5):732–743. **(IF: 6.655; pkt MNiSW: 45; liczba cytowań: 2); praca oryginalna. Udział własny szacuję na 80%** (obejmuje pełne przygotowanie koncepcji pracy i planu badań, wybór metodyki badań, pobranie świeżego materiału diagnostycznego do badań cytometryczno-cytogenetyczno-molekularnych od 13 chorych z bardzo agresywnymi chłoniakami B-komórkowymi, przypominającymi chłoniaka Burkitta (BLL,11q), z powtarzalną zmianą

cytogenetyczno-molekularną obejmującą długie ramię chromosomu 11. Ponadto, pobranie podobnego materiału od 20-to osobowej grupy walidacyjnej z potwierdzonym rozpoznaniem klasycznego chłoniaka Burkitta (BL) w badaniach histopatologiczno-cytometryczno-cytogenetycznych. Udział obejmuje również przeprowadzenie badań, analizę statystyczną i interpretację otrzymanych wyników, analizę piśmiennictwa, przygotowanie rycin i tekstu manuskryptu, odpowiedzi na recenzje, korekta pracy przed złożeniem do druku.

- 6) Wagener R, Seufert J, Raimondi F, Bens S, Kleinheinz K, Nagel I, Altmüller J, Thiele H, Hübschmann D, Kohler ChW, Nürnberg P, Au-Yeung R, Burkhardt B, Horn H, Leoncini L, Jaffe ES, Ott G, **Rymkiewicz G**, Schlesner M, Russell RB, Klapper W, Siebert R (2018). The mutational landscape of Burkitt-like lymphoma with 11q aberration is distinct from that of Burkitt lymphoma. *Blood* 2018: doi.org/10.1182/blood-2018-07-864025 (**IF: 15,132; pkt MNiSW: 50; liczba cytowań: 0**); **krótki raport. Udział własny szacuję na 6%** (obejmuje przekazanie 2 wyselekcjonowanych materiałów diagnostycznych (bloczków parafinowych) wraz z obrazem histopatologicznym (przygotowanie licznych zdjęć histopatologicznych dla potrzeb recenzentów umieszczone w publikacji jako Supplemental Appendix 1) oraz pełnych danych klinicznych związanych z przebiegiem leczenia, udział w pisaniu manuskryptu i redagowaniu tekstu przed złożeniem do recenzji). Wyżej przekazane bloczki parafinowe zdiagnozowałem jako BLL,11q.
- 7) Walewski J, Domanska-Czyz K, **Rymkiewicz G**. Burkitt lymphoma and leukemia. Patients without HIV infection (2011). In: Recommendations of the European Working Group for Adult ALL. In: Gökbuget N, Bassan R (eds). Recommendations of the European Working Group for Adult ALL., 1st ed. Bremen - London - Boston: UNI-MED Verlag AG edn2011, pp 29-40; rozdział w książce. **Udział własny szacuję na 25%** obejmuje napisanie podrozdziału dotyczącego diagnostyki rutynowej (histopatologicznej) oraz cytometrycznej i cytogenetycznej materiału uzyskiwanego dzięki biopsji aspiracyjnej cienkoigłowej w chłoniaku Burkitta. Zebrałem również odpowiednie piśmiennictwo.

Ponadto, w celu podkreślenia roli cytometrii przepływowej materiału uzyskiwanego dzięki biopsji cienkoigłowej w diagnostyce różnicowej bardzo agresywnych chłoniaków: chłoniaka Burkitta (BL), chłoniaka podobnego do chłoniaka Burkitta z aberracją 11q (BLL,11q) i chłoniaków z komórek B o wysokim stopniu złośliwości z rearanżacją genu *MYC* i *BCL2* (HGBL,R) oraz chłoniaków z komórek B o wysokim stopniu złośliwości, bliżej nieokreślonych (HGBL,NOS) włączyłem 3 plakaty i streszczenia zjazdowe opublikowane w *Blood journal*, które wiążą się z pracami wchodzącymi w skład Osiągnięcia Naukowego.

Poniższe streszczenia/plakaty formalnie nie wchodzą w skład prezentowanego Osiągnięcia Naukowego (rozumianego wyłącznie jako prace opublikowane z IF), jednakże wraz z pozostałymi pracami, tworzą jednolity tematycznie ciąg prac:

- 8) **Rymkiewicz G**, Blachnio K, Grygalewicz B, Bystydziński Z, Woroniecka R, Sledz-Gawronska B, Romejko-Jarosinska J, Domamska-Czyz K, Zajdel M, Sikorska-Mali K, Siwicki JK, Pienkowska-Grela B, Prochorec-Sobieszek M, Walewski J (2014). Flow Cytometry and Cytogenetics of Fine Needle Aspiration Biopsy Samples Is a Reliable Method for Diagnosing Burkitt Lymphoma. Evaluation of 78 Cases from a Single-Institution. *Blood* 2014;124:1640-1640, **plakat i streszczenie zjadowe; liczba cytowań: 3. Udział własny szacuję na 90%** z pełnym przygotowaniem koncepcji pracy.
- 9) **Rymkiewicz G**, Chechlińska M, Grygalewicz B, Pienkowska-Grela B, Blachnio K, Bystydziński Z, Romejko-Jarosinska J, Sledz-Gawronska B, Zajdel M, Domamska-Czyz K, Woroniecka R, Sikorska-Mali K, Siwicki JK, Prochorec-Sobieszek M, Walewski J (2015). Significance of a Critical Set of 11q Chromosome Aberrations for Diagnosis of *MYC* Negative Burkitt Lymphoma. *Blood* 2015;126:2679-2679, **plakat i streszczenie zjadowe; liczba cytowań: 2. Udział własny szacuję na 90%** z pełnym przygotowaniem koncepcji pracy.
- 10) **Rymkiewicz G**, Romejko-Jarosinska J, Blachnio K, Grygalewicz B, Chechlińska M, Paszkiewicz-Kozik E, Domańska-Czyż K, Ostrowska B, Dąbrowska-Iwanicka A, Woroniecka R, Borkowska K, Śledź-Gawrońska B, Osowiecki M, Targoński Ł, Bystydziński Z, Sikora-Mali K, Popławska L, Wyleżoł I, Szymański M, Świerkowska-Czeneszew M, Borawska A, Prochorec-Sobieszek M, Pienkowska-Grela B, Walewski J (2016). DA-EPOCH-R Is an Effective Regimen in High Grade B-Cell Lymphoma Defined By Cell-of-Origin, Karyotype and BCL2/MYC/BCL6 Status and Expression. *Blood* 2016;128:1754-1754, **plakat i streszczenie zjadowe; liczba cytowań: 1. Udział własny szacuję na 70%** z pełnym przygotowaniem koncepcji pracy.

Wszystkie publikacje wraz z rozdziałem w książce w języku angielskim o zasięgu międzynarodowym i trzema abstraktami/plakatai przedstawianymi od 2014 do 2016 na ASH (*The American Society of Hematology*) i opublikowanymi w *Blood* journal są wieloautorskie, a oświadczenia współautorów i opis indywidualnego wkładu habilitanta w powstanie tych prac znajduje się z załączniku 8. Publikacje, które wchodzą w skład cyklu prac stanowiących moje Osiągnięcie Naukowe w rozumieniu art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2014 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w

zakresie sztuki (Dz. U nr 65, poz. 595 ze zm.), jak dotychczas były pierwszymi i jedynymi w skali światowej publikacjami dotyczącymi nowego podtypu chłoniaka, którego odkrycie w 2011r przez zespół pracowników Centrum Onkologii w Warszawie, zostało uwzględnione w nowej aktualizacji klasyfikacji WHO 2017. Fakt, że wchodzące w skład cyklu prace są cytowane w nowych publikacjach i w nowej aktualizacji klasyfikacji WHO 2017 nowotworów układu chłonnego wskazuje, że wnoszą one istotne informacje do dyskusji nad nowo odkrytym podtypem chłoniaka przypominającym BL, ale bez rearanzacji genu *MYC* i są faktycznie zwieńczeniem wieloletnich poszukiwań mechanizmu molekularnego odpowiedzialnego za rozwój „*MYC-negative*” BL. Należy zwrócić uwagę, że opracowany przeze mnie algorytm pozwolił na zdiagnozowanie 19 przypadków „Burkitt-like lymphoma with 11q aberration” (BLL,11q), największej liczby przypadków na świecie, zdiagnozowanych i opublikowanych przez autora Osiągnięcia Naukowego. Wynikało to bezpośrednio z rutynowej (unikalnej na skalę polską i światową) diagnostyki prawie wszystkich agresywnych chłoniaków za pomocą samodzielnie stworzonego algorytmu badań cytometryczno-cytogenetyczno-molekularnych materiału uzyskanego dzięki samodzielnie wykonywanej biopsji cienkoigłowej (często w łączności z badaniami histopatologiczno-immunohistochemicznymi, które również oceniam samodzielnie jako hematopatolog). Rozpoznanie cytometryczne ustaliam zawsze w oparciu o obraz kliniczno - radiologiczno (ocena echogeniczności, typ ukrwienia guza, ilości guzów w badaniu USG) - patologiczny choroby (i przeprowadzany wywiad z chorymi), metodami zwykle niedostępnymi dla lekarzy patomorfologów i cytometrystów. W latach 1997-2018 wykonałem łącznie ponad 12 tysięcy badań cytometrycznych, opartych głównie na materiale uzyskanym dzięki biopsji cienkoigłowej (ponad 10 tysięcy badań), w Osiągnięciu Naukowym wykorzystałem dane pochodzące od około 180 chorych zdiagnozowanych za pomocą w/w algorytmu.

C) Streszczenie: Osiągnięcia Naukowego

Mój wkład w powstanie Osiągnięcia Naukowego pod tytułem: **Charakterystyka kliniczno-patologiczna i molekularna *MYC-negative* ‘Burkitt-like lymphoma with 11q aberration’ (BLL,11q), nowej tymczasowej jednostki nozologicznej (WHO 2017); autorski algorytm diagnostyczny oparty o cytometrię przepływową, umożliwiający rozpoznanie BLL,11q w 1,5 godziny od wykonania biopsji cienkoigłowej**, związany jest z wynikami badań obejmujących odkrycie i pełną charakterystykę kliniczno-patomorfologiczno-molekularną nowego podtypu chłoniaka, jak również opracowanie szybkiej metody diagnostyki BLL,11q. Wyniki te zostały przedstawione w sześciu

publikacjach, w których jestem współautorem (do grudnia 2018 opublikowano 8 publikacji na temat tej nowej jednostki nozologicznej). W praktyce klinicznej dotyczącej diagnostyki agresywnych chłoniaków jest to niezwykle istotne, że za pomocą zaproponowanego algorytmu można ustalić precyzyjne rozpoznania tego samego dnia, w którym chory pojawia się w szpitalu. Omawiane w Osiągnięciu Naukowym bardzo agresywne chłoniaki są stanem nagłym w onkologii, szczególnie w jamie brzusznej czy w klatce piersiowej, wymagającym jak najszybszego wdrożenia intensywnego leczenia opartego na prawidłowym rozpoznaniu podtypu chłoniaka zgodnie z obowiązującą klasyfikacją WHO.

W 2011 opisaliśmy, po raz pierwszy na świecie, nieznaną wcześniej postać chłoniaka podobnego do chłoniaka Burkitta (BL) bez rearanżacji genu *MYC* (*Pieńkowska-Grela B i Rymkiewicz G et al., Partial trisomy 11, dup(11)(q23q13), as a defect characterizing lymphomas with Burkitt pathomorphology without MYC gene rearrangement, Med Oncol. 2011*) ale z duplikacją i inwersją zduplikowanego fragmentu długiego ramienia chromosomu 11, widocznych w klasycznych badaniach cytogenetycznych (ang. *classical cytogenetics*, CC) - kariotyp uzupełniony fluorescencyjną hybrydyzacją in situ (ang. *fluorescent in situ hybridization*, FISH) przy użyciu kilku sond FISH. Publikacja była oparta na 4 przypadkach, zdiagnozowanych w naszym ośrodku w latach 1998-2011. W kolejnej publikacji (*Salaverria I, et al., A recurrent 11q aberration pattern characterizes a subset of MYC-negative high-grade B-cell lymphomas resembling Burkitt lymphoma, Blood 2014*) scharakteryzowaliśmy molekularnie, między innymi, za pomocą porównawczej hybrydyzacji genomowej do mikromacierzy z oceną polimorfizmu pojedynczych nukleotydów (ang. *Array comparative genomie hybridization and single nucleotide polymorphism*, aCGH/SNP), powtarzalne zmiany na długim ramieniu chromosomu 11, jako *11q-gain/loss*, na dostępnych kilkunastu przypadkach (w tym 4 z Polski). Na podstawie tych dwóch prac (i publikacji z zespołu Profesor Iwony Włodarskiej „*Post-transplant molecularly defined Burkitt lymphomas are frequently MYC-negative and characterized by the 11q-gain/loss pattern*”, *Haematologica 2015*) w roku 2017 chłoniak podobny do BL z *11q-gain/loss* został włączony, jako tymczasowa jednostka/kategoria nozologiczna, do zaktualizowanej klasyfikacji 2017 WHO, jako chłoniak podobny do chłoniaka Burkitta z aberracją 11q (ang. *MYC-negative “Burkitt-like lymphoma with 11q aberration”*, BLL,11q). W kolejnych pracach porównaliśmy ekspresję miRNA w BLL,11q z innymi bardzo agresywnymi chłoniakami z komórki B typu: BL, chłoniak rozlany z dużych komórek B, bliżej nieokreślony (ang. *Diffuse large B-cell lymphoma, not otherwise specified*, DLBCL,NOS) i chłoniak z komórek B o wysokim stopniu

złośliwości (ang. *High-grade B-cell lymphoma, HGBL*) (Zajdel M i Rymkiewicz G et al., *miR expression in MYC-negative DLBCL/BL with partial trisomy 11 is similar to classical Burkitt lymphoma and different from diffuse large B-cell lymphoma, Tumour Biol 2015*) w materiale obejmującym ponad 100 biopsji cienkoigłowych. W pracy przedstawiliśmy podobieństwa w poziomie ekspresji badanych miRNA i dwóch wybranych genów w BL i BLL,11q, które różniły się od tych w DLBCL,NOS, co może sugerować, wraz z innymi danymi o podobieństwie morfologiczno-immunofenotypowo-molekularnym, wspólną wyjściową komórkę (*cell of origin*) ośrodków rozmnażania (ang. *Germinal centre B-cell type, GCB*), z której powstaje BL i BLL,11q (Rymkiewicz G, et al., *A comprehensive flow-cytometry-based immunophenotypic characterization of Burkitt-like lymphoma with 11q aberration, Mod Pathol 2018*, Wagener R, et al., *The mutational landscape of Burkitt-like lymphoma with 11q aberration is distinct from that of Burkitt lymphoma, Blood 2018*). W kolejnej pracy wykazaliśmy unikalny immunofenotyp BLL,11q w badaniach cytometrycznych (ang. *Flow cytometry method, FCM*) i immunohistochemicznych (ang. *Immunohistochemistry, IHC*) (Rymkiewicz G et al. 2014 abstrakt, Rymkiewicz G et al. *A comprehensive flow-cytometry-based immunophenotypic characterization of Burkitt-like lymphoma with 11q aberration, Mod Pathol 2018*) w porównaniu do wcześniej scharakteryzowanych przez nas cech immunofenotypowych BL w badaniach FCM/IHC (Walewski J et al., *Burkitt lymphoma and leukemia. Patients without HIV infection (2011). In: Recommendations of the European Working Group for Adult ALL 2011, rozdział w książce, Rymkiewicz G et al., abstrakt Blood 2014, Rymkiewicz G et al., A comprehensive flow-cytometry-based immunophenotypic characterization of Burkitt-like lymphoma with 11q aberration, Mod Pathol 2018*).

Morfologia obu podtypów chłoniaka Burkitta często jest bardzo podobna a fenotyp jest nieco inny, ale mają one również wiele wspólnych cech immunofenotypowych. Skorelowaliśmy występowanie ekspresji CD56 na komórkach BLL,11q z lokalizacją genu dla tego antygenu (*NCAM1*) w lokalizacji na 11q (11q23), który ulega duplikacji w prawie wszystkich przypadkach BLL,11q. W kolejnej pracy (Grygalewicz B et al., *The 11q-gain/loss aberration occurs recurrently in MYC-negative Burkitt-like lymphoma with 11 q aberration as well as MYC-positive Burkitt lymphoma and MYC-positive high grade B-cell lymphoma, NOS, Am J Clin Pathol 2017*) scharakteryzowaliśmy heterogenność molekularną aberracji *11q-gain/loss*, jako *critical set of 11q aberration* (istnienie równoczesne 3 zmian w obrębie 11q: duplikacji (dup) fragmentu długie ramienia chromosomu 11q, wraz z jego inwersją (inv) oraz telomeryczną delecją (del) 11q) i *non-critical set of 11q aberration* (kiedy brakuje chociażby

jednej z w/w aberracji: dup/inv/del) (Rymkiewicz G et al., *abstrakt Blood 2015*, Wagener R, et al., *The mutational landscape of Burkitt-like lymphoma with 11q aberration is distinct from that of Burkitt lymphoma Blood, 2018*) i potwierdziliśmy, że aberracja 11q-gain/loss nie jest swoista wyłącznie dla BLL,11q, ale występuje również rzadko w BL (poza typową rearanżacją MYC) i w części przypadków, które obecnie klasyfikujemy jako HGBL (Grygalewicz B et al., *The 11q-gain/loss aberration occurs recurrently in MYC-negative Burkitt-like lymphoma with 11 q aberration as well as MYC-positive Burkitt lymphoma and MYC-positive high grade B-cell lymphoma, NOS, Am J Clin Pathol 2017*), a nie można również wykluczyć występowania w nielicznych przypadkach DLBCL,NOS (Rymkiewicz G et al., *A comprehensive flow-cytometry-based immunophenotypic characterization of Burkitt-like lymphoma with 11q aberration, Mod Pathol 2018*). Skorelowaliśmy występowanie guzów typu bulky>20cm z amplifikacją regionu 11q23.3, w którym znajduje się KMT2A (Grygalewicz B et al., *The 11q-gain/loss aberration occurs recurrently in MYC-negative Burkitt-like lymphoma with 11 q aberration as well as MYC-positive Burkitt lymphoma and MYC-positive high grade B-cell lymphoma, NOS, Am J Clin Pathol 2017*). Cykl prac zamyka publikacja Wagener R et al., *The mutational landscape of Burkitt-like lymphoma with 11q aberration is distinct from that of Burkitt lymphoma, Blood 2018*, w której, między innymi, za pomocą sekwencjonowania DNA (polega na selektywnym wybraniu sekwencji kodujących genomu BLL,11q, ich wzbogaceniu i sekwencjonowaniu w technologii sekwencjonowania następnej generacji (ang. *Next Generation Sequencing*, NGS) wykazaliśmy, że obraz mutacyjny MYC-negative BLL,11q różni się od tego w sporadycznej postaci MYC-positive BL, jak również w innych chłoniakach z ośrodków rozmnażania np. DLBCL,NOS, GCB, czy w chłoniaku grudkowym (ang. *follicular lymphoma*, FL). Stwierdziliśmy również, że inaktywacja bi-alleliczna wskazuje na patogenną rolę kompleksu INO80 genu NFRKB (ang. *Nuclear factor related to kappa-B-binding*) w patogenezie BLL,11q.

Całość historii odkrycia i charakterystykę kliniczno-patomorfologiczno-molekularną BLL,11q opisuję w kontekście podobieństw i różnic kliniczno-patomorfologiczno-molekularnych dotyczących MYC-positive BL (Walewski J, et al., *Burkitt lymphoma and leukemia. Patients without HIV infection. In: Recommendations of the European Working Group for Adult ALL. In: Gökbüget N, Bassan R (eds). Recommendations of the European Working Group for Adult ALL 2011*), w których wykazałem liczne podobieństwa między BLL,11q a MYC-positive BL w zakresie epidemiologii, obrazu klinicznego choroby, krzywych przeżycia przy stosowaniu intensywnych programów immunochemioterapii

dedykowanych leczeniu BL, morfologii, immunofenotypu, profilu ekspresji genów i ich metylacji, ale wyraźne różnice w zakresie cytogenetycznym i spektrum mutacyjnym genów zaangażowanych w patogenezie omawianych chłoniaków. Upraszczając można stwierdzić, że odkrycie BLL,11q wynikało bezpośrednio z badań FCM z materiału z biopsji cienkoigłowej skorelowanych z badaniami CC uzyskiwanych z tego samego materiału.

Podsumowując i podkreślając wysoką czułość badania FCM w odkryciu i diagnostyce BLL,11q potwierdziliśmy bardzo wysoką użyteczność oceny nadekspresji antygenu CD38 (CD38^{higher}) na komórkach BL w stosunku do ekspresji CD38 na prawidłowych limfocytach T w badaniu FCM, jako wykładnik rearanżacji *MYC* i najprostszy oraz najszybszy sposób jego wykrywania w rutynowej diagnostyce nowotworów układu chłonnego. Potwierdzenie rearanżacji *MYC* jest obecnie kluczowym elementem diagnostyki i planowania leczenia w bardzo agresywnych chłoniakach B-komórkowych (Rymkiewicz G et al., *abstrakt Blood 2014*, Rymkiewicz G et al., *abstrakt Blood 2016*, Rymkiewicz G et al., *A comprehensive flow-cytometry-based immunophenotypic characterization of Burkitt-like lymphoma with 11q aberration, Mod Pathol 2018*). Komórki BLL,11q z uwagi na brak rearanżacji *MYC* mają znamienne statystycznie niższą ekspresję CD38 (CD38⁺) w FCM, porównywalną z ekspresją na limfocytach T. Współistnienie rearanżacji genu *MYC* i *BCL2* charakteryzuje z kolei bardzo źle rokującą grupę *double hit* lymphomas, typu HGBL z rearanżacją genu *MYC* i *BCL2* (ang. *High-grade B-cell lymphomas with MYC and BCL2 rearrangements, HGBL,R*) (Rymkiewicz G et al., *abstrakt Blood 2016*). We wspomnianych pracach zawartych w Osiągnięciu Naukowym udowodniliśmy, że zarówno BL (CD38^{higher}/CD16/CD56⁻/BCL2⁻) jak i BLL,11q (CD38⁺/CD16/CD56⁺/BCL2⁻) oraz HGBL,R (CD38^{higher}/CD16/CD56⁻/BCL2^{higher}) bardzo łatwo różnicować w badaniu cytometrycznym między sobą, mimo podobieństwa tych bardzo agresywnych chłoniaków w obrazie kliniczno-laboratoryjnym i histopatologicznym (ang. *Histopathology, HP*). W dużym uproszczeniu można powiedzieć, że FCM umożliwia ocenę rearanżacji genów *MYC* i *BCL2* (lub ewentualnie powielenie/amplifikację tych genów o podobnym znaczeniu biologicznym do rearanżacji) oraz aberracji 11q z bardzo dużym prawdopodobieństwem w przeciągu 1,5 godziny od pobrania materiału. Natomiast ocena rearanżacji tych genów lub aberracji 11q w materiale z bloczka parafinowego, przygotowanego z tkanki pobranej chirurgicznie, zwykle wydłuża czas uzyskania wyniku do jednego miesiąca. Dodatkowo, brak standardu diagnostyki cytogenetycznej BLL,11q z bloczków parafinowych w jakiegokolwiek pracowni cytogenetyki w Polsce. Diagnostyka agresywnych i bardzo „szybko” przebiegających chłoniaków (zagrożających życiu chorych i

wymagających adekwatnej i natychmiastowej chemioterapii), za pomocą metody FCM materiału uzyskanego dzięki biopsji aspiracyjnej cienkoigłowej (ang. *fine needle aspiration biopsy*, FNAB) umożliwia diagnostykę różnicową tych chłoniaków po około 1,5 godziny od FNAB. Dotychczas nie ma jakiegokolwiek standardu oceny rearanżacji *MYC*, *BCL2* i aberracji 11q w Zakładach Patomorfologii w Polsce i większość decyzji terapeutycznych podejmowanych jest przez klinicystów bez wiedzy na temat stanu rearanżacji/aberracji w/w genów. Rutynowy sposób pobierania materiału metodą chirurgiczną do badań HP/IHC jest długi i często niewystarczający do ustalenia prawidłowego rozpoznania, bez równoczesnych badań cytogenetycznych, (do których mają rutynowy dostęp nieliczne ośrodki w Polsce), koniecznych do ustalenia ostatecznego rozpoznania zgodnie z nową aktualizacją klasyfikacji WHO 2017. Nadal część młodych pacjentów z w/w agresywnymi chłoniakami, (którzy mogliby być wyleczeni) ginie w oczekiwaniu na ostateczne rozpoznanie (2-3 tygodnie), jak również z powodu powikłań po zabiegu operacyjnym, na przykład usunięciu guza jamy brzusznej. Moje doświadczenie diagnostyczne metody FNAB/FCM/CC/FISH, (którą wprowadziłem do rutynowej diagnostyki w Centrum Onkologii-Instytucie w Warszawie) jest oparte na ponad 12000 przypadków chłoniaków (w tym ponad 10000 przypadków dzięki FNAB), które zdiagnozowałem w latach 1998-2018 w konfrontacji z wynikami CC/FISH (materiału uzyskiwanego również za pomocą FNAB) i obrazem histopatologicznym oraz pełnym obrazem klinicznym choroby (wywiad od chorego, jaki uzyskiwałem podczas nakłuwania chorych). Często diagnozowałem przypadki cytometrycznie w łączności z obrazem radiologicznym nakłuwanych guzów jamy brzusznej, czy głęboko usytuowanych węzłów/guzów o lokalizacji powierzchniowej, co również ułatwia diagnostykę różnicową chłoniaków. Należy podkreślić, że wszystkie FNAB wykonałem samodzielnie, dbając o odpowiednią ilość komórek, które każdorazowo i rutynowo oceniamy i liczymy przy łożku chorego za pomocą błękitu trypanu w komorze Bürkera w mikroskopie świetlnym i ich najwyższą jakość do dalszych badań, co doprowadziło do wystandaryzowania procedury pobierania zawiesiny komórek i ich natychmiastowego znakowania przeciwciałami monoklonalnymi oraz ich biobankowania. Dodatkowo, okazało się, że FNAB/FCM jest metodą bardzo bezpieczną, „nieinwazyjną” oraz niedającą powikłań przy przestrzeganiu podstawowych zasad dotyczących parametrów krzepnięcia i ilości nakłuć w zależności od lokalizacji guza w jamie brzusznej (wykonałem ponad 1000 FNAB/FCM guzów jamy brzusznej pod kontrolą USG) czy w klatce piersiowej (wykonałem ponad 60 FNAB/FCM guzów śródpiersia przedniego pod kontrolą CT). Zawiesinę komórkową dzięki FNAB

uzyskiwałem przy pomocy strzykawki o pojemności 20 ml połączonej z różnorodnymi igłami (zestaw był często również połączony z rączką aspiracyjną). Iglę prowadziłem w kierunku docelowego guza/węzła chłonnego techniką bez urządzeń wspomagających lub za pomocą urządzenia prowadzącego przymocowanego do sondy lub bezpośrednio wprowadzonego przez kanał biopsyjny przetwornika. Końcówkę igły obserwowałem na ekranie USG podczas biopsji. Zwykle 10 do 20 (4-5 nakłucia w przypadku FNAB jamy brzusznej/śródpiersia przedniego) nakłuć wystarczało do uzyskania adekwatnego ilościowo materiału do badań FCM/CC/FISH i biobankowania. Zawiesinę komórek do FCM, badań molekularnych i biobankowania aspirowałem w PBS-ie zawierającym K2-EDTA, a do badań CC/FISH zawierających heparynę w PBS. FNAB/FCM całkowicie wyeliminowała powikłania związane z wycinaniem guzów jamy brzusznej lub węzłów w różnorodnych lokalizacjach (obrzęk limfatyczny). Metoda FNAB/FCM/CC/FISH, czasami oparta na 20 nakłuciach w przeciągu 30 minut, jest wystarczająca do uzyskania odpowiedniej ilości komórek (zwykle powyżej 10 milionów) umożliwiających uzyskanie wyników cytogenetycznych w BLL,11q (i innych nowotworach układu chłonnego zwykle w przeciągu 3-4 dni) z charakterystycznym *simple* lub *low complex karyotype*, nieco bardziej złożonym niż w BL (Rymkiewicz G et al., *abstrakt Blood* 2015, Grygalewicz B et al., *The 11q-gain/loss aberration occurs recurrently in MYC-negative Burkitt-like lymphoma with 11 q aberration as well as MYC-positive Burkitt lymphoma and MYC-positive high grade B-cell lymphoma, NOS. Am J Clin Pathol* 2017, Rymkiewicz G et al., *A comprehensive flow-cytometry-based immunophenotypic characterization of Burkitt-like lymphoma with 11q aberration. Mod Pathol* 2018), z dwoma różnej wielkości chromosomami 11, krótszym prawidłowym chromosomem 11 i aberentnym chromosomem 11 - o dłuższym, nieprawidłowym ramieniu q (widocznym, jako duplikacja, opisana przez nas po raz pierwszy - Pieńkowska-Grela B i Rymkiewicz G et al., *Partial trisomy 11, dup(11)(q23q13), as a defect characterizing lymphomas with Burkitt pathomorphology without MYC gene rearrangement, Med Oncol* 2011). Ponadto, materiał uzyskiwany drogą FNAB okazał się idealnym materiałem do analizy molekularnej BLL,11q (Zajdel M i Rymkiewicz G et al., *Tumour Biol* 2015, Grygalewicz B et al., *Am J Clin Pathol* 2017, Rymkiewicz G et al., *Mod Pathol* 2018, Wagener R, et al., – praca o BLL,11q w trakcie realizacji, Dave SS et al. – praca o BLL,11q w trakcie realizacji).

D) Opis szczegółowy Osiągnięcia Naukowego

Wstęp oparty na: Walewski J, et al., *Burkitt lymphoma and leukemia. Patients without HIV infection. In: Recommendations of the European Working Group for Adult ALL. In:*

Gökbuget N, Bassan R (eds). Recommendations of the European Working Group for Adult ALL 2011.

Chłoniak Burkitta (BL) jest bardzo agresywnym chłoniakiem nie-Hodgkina, głównie młodych mężczyzn i dzieci/młodzieży (ale widoczne są dodatkowe, rzadziej występujące „piki zachorowania” w 4 i 7-8 dekadzie życia), rozwijającym się z dojrzałych limfocytów B ośrodków rozmnażania. BL charakteryzuje blisko stuprocentowa frakcja proliferacyjna, najkrótszy wśród nowotworów czas podwojenia masy guza (populacji komórek nowotworowych), wynoszący około 26 godzin i wysoki odsetek komórek ulegających apoptozie. BL jest stanem nagłym, wymagającym jak najszybszego wdrożenia intensywnego leczenia, szczególnie w jamie brzusznej. Opóźnienie terapii czy leczenie nieoptymalne (złym schematem immunochemioterapii, po ustaleniu nieprecyzyjnego rozpoznania histopatologicznego), znacznie pogarszają szanse chorego na wyleczenie, ponieważ leczenie nieoptymalne, chwilowo redukuje masę guza ale równocześnie wpływa na pojawienie się szybkiej oporności na leczenie (która występuje zawsze w BL po nieadekwatnym zastosowaniu leczenia R-CHOP, - rituximab, cyklofosfamid, doksorubicyna {nazwa chemiczna Hydroxydaunomycyna}, winkrystyna {Oncovin} i prednizon) i gwałtownym nawrotem choroby. Natomiast zastosowanie w odpowiednio krótkim czasie intensywnej immunochemioterapii, na przykład według programu:

- GMALL/B-ALL/NHL 2002, zawierającego: 3 bloki 5-dniowej intensywnej chemioterapii stosowane naprzemiennie do 6 kursów: blok A: frakcjonowany ifosfamid, metotreksat, winkrystyna, tenipozyd, cytarabina; blok B: frakcjonowany cyklofosfamid, metotreksat, winkrystyna, doksorubicyna, cytarabina; blok C: windezyna, metotreksat, etopozyd, cytarabina. Ponadto, w każdym cyklu leczenia: deksametazon i trójlekowe leczenie dokanałowe. W 1 dniu każdego cyklu – rituximab oraz 2 dawki podtrzymujące po zakończeniu chemioterapii, czy,

- R-CODOX-M/IVAC, zawierającego 3 kursów CODOX-M dla chorych bez czynników ryzyka lub z 4 kursów naprzemiennych CODOX-M i IVAC dla chorych o ryzyku podwyższonym. Program ten zawiera frakcjonowany cyklofosfamid, doksorubicynę, winkrystynę i metotreksat w wysokich dawkach, stosowane naprzemiennie z frakcjonowanym ifosfamidem, etopozydem i cytarabiną w wysokich dawkach oraz trójlekowe leczenie dokanałowe, które są stosowane w Klinice Nowotworów Układu Chłonnego Centrum Onkologii w Warszawie i „dają” bardzo wysokie 80–90% prawdopodobieństwo całkowitego wyleczenia. Występują trzy warianty epidemiologiczne BL związane z różną prezentacją

kliniczną i różnorodną częstością infekcji wirusem Epstein-Barr (EBV). W postaci sporadycznej BL (sBL) najczęściej obserwowane są pojedyncze guzy pozawęzłowe jamy brzusznej, głównie okolicy krętniczo-kątniczej, żołądka, jajników, nerek lub gruczołów piersiowych oraz guzy węzłowe: okolic szyi (najczęstsze), pach lub pachwin. W postaci powstałej na tle niedoboru odporności (iBL) w przebiegu infekcji HIV/AIDS, często występuje zajęcie węzłów chłonnych z naciekiem okołowęzłowym tkanek miękkich i szpiku. Natomiast w postaci endemicznej BL (eBL), niewystępującej w Polsce, częste jest (50%) zajęcie kości szczęki i innych kości twarzy, w tym oczodołów. W każdym z 3 wariantów BL występuje ryzyko zajęcia ośrodkowego układu nerwowego i szpiku. Zajęcie węzłów chłonnych znacznie częściej występuje u dorosłych aniżeli u dzieci. Rzadko pojawia się zajęcie pierścienia Waldeyera/migdałów czy śródpiersia/tarczycy.

Histopatologicznie i cytologicznie komórki BL są średniej wielkości, monomorficzne z kilkoma drobnymi jąderkami w strukturze chromatyny, centralnie położonego okrągłego jądra, i zasadochłonną cytoplazmą oraz wykazują rozlany i ekspansywny wzrost powodujący prawie 100% wyparcie prawidłowych limfocytów T i B. W większości przypadków duży odsetek komórek BL ulega apoptozie i usuwaniu/fagocytowaniu przez makrofagi, co w barwieniu May-Grunwald-Giemzy (MGG) oraz hematoksyliną i eozyną (HE) widoczne jest w postaci charakterystycznego, ale nieswoistego obrazu gwiazdzistego nieba (ang. *Starry sky appearance*). Przypadki BL mogą jednak wykazywać różnice w morfologii utrudniające diagnostykę HE np. bez w/w obrazu gwiazdzistego nieba lub bardziej heterogennymi pod względem wielkości, pleomorficznymi komórkami czy drobnymi komórkami z jednym centralnym jąderkiem (*Walewski J et al., 2011 rozdział w książce, Rymkiewicz G et al., 2014 abstrakt*).

Immunofenotyp BL w badaniach IHC charakteryzuje się następującymi odczynami: CD20(+)/CD10(+)/MYC(+)/LMO2(-)/BCL6(+)/BCL2(-)/MUM1(-)/CD43(+)/CD44(-)/IgM (+)/CD56(-)/CD138(-) i jest charakterystyczny dla chłoniaków wywodzących się z GCB. Blisko 100% komórek ma aktywność proliferacyjną mierzoną za pomocą indeksu Ki67 (*Walewski J et al., 2011 rozdział w książce, Rymkiewicz G et al., abstrakt Blood 2014, Rymkiewicz G et al., Mod Pathol 2018*). W FCM (krew obwodowa/szpik w przypadkach białaczki Burkitta, płyn wysiękowy jamy brzusznej w przypadkach guzów jamy brzusznej i miednicy, płyn mózgowo-rdzeniowy lub najczęściej zawiesina komórek z biopsji cienkoigłowej guza) komórki BL wykazują ekspresję CD45^{weaker} i antygenów limfocytów B (CD19, CD20, CD22 i CD79a/CD79β), HLADR, CD10, CD38^{higher}, CD81^{higher}, BCL6, i

koekspresję CD43 oraz wykazują powierzchniowe nagromadzenie monoklonalnego łańcucha ciężkiego klasy IgM, rzadziej IgM/IgD w wariacie sBL i eBL) lub IgG (w postaci iBL) oraz jednego z łańcuchów lekkich (kappa lub lambda). Mediana intensywności fluorescencji (ang. *Median Fluorescence Intensity*, MFI) CD20 (w uproszczeniu opisująca ilość antygeny na komórkach nowotworowych) jest przykładowo, większa niż CD19, a ta wartość MFI jest wyższa niż CD22, co oznacza, że ilość antygeny CD20>CD19>CD22 na komórkach BL. Komórki BL nie wykazują ekspresji antygenów: CD5, CD11c, CD16/CD56, CD23, CD25, CD200, CD305, BCL2, TdT. Ekspresja CD62L, CD44, CD54 jest najczęściej niewykrywalna lub wykrywalna, jako śladowa ekspresja na niewielkiej subpopulacji komórek BL. W części przypadków (szczególnie iBL) może występować różnicowanie plazmocytoide: CD56(+)/CD138(+) (ale ekspresja CD56 jest niewykrywana za pomocą mieszaniny przeciwciał CD16/CD56 [fluorochrom PE (fikoerytryna) - skoniugowany z klonem mieszaniny przeciwciał B73,1/MY31] do oznaczania limfocytów NK). Ekspresję CD71, traktowaną jako ocenę aktywności proliferacyjnej w FCM, obserwuje się w 100% komórek (Walewski J et al., 2011 rozdział w książce, Rymkiewicz G et al., abstrakt Blood 2014, Rymkiewicz G et al., Mod Pathol 2018).

BL wyróżnia spośród agresywnych chłoniaków prosty kariotyp, w którym zgodnie z kryteriami WHO, prócz rearanżacji *MYC*, może wystąpić maksymalnie 6 zmian CC, obejmujących głównie: powielenie 1q, 7 i 12 oraz utratę 6q, 13q32-34 i 17p. W 40% przypadków BL obserwowana jest pojedyncza zmiana cytogenetyczna – translokacja *MYC*. Jest ona charakterystyczna, choć niespecyficzna dla BL (występuje również, między innymi, w HGBL,R, HGBL,NOS i DLBCL,NOS i innych podtypach DLBCL) i stanowi główną zmianę patogenetyczną tego nowotworu. W około 80% jest to translokacja t(8;14)(q24;q32), powodująca przeniesienie części kodującej genu *MYC* (locus 8q24) pod kontrolę sekwencji regulatorowej wzmacniacza (promotora) transkrypcji genu *IGH*, kodującego łańcuch ciężki immunoglobulin (locus 14q32). W komórkach BL w miejsce t(8;14)(q24;q32) mogą wystąpić translokacje wariantowe obejmujące locus *MYC* oraz loci genów kodujących łańcuchy lekkie immunoglobulin: *IGK* (kappa; locus 2p12; około 15% przypadków) lub *IGL* (lambda; locus 22q11; około 5% przypadków). Translokacje *MYC* prowadzą do nadmiernej aktywacji tego onkogenu, a tym samym do wzrostu ekspresji czynnika transkrypcyjnego *MYC* i w konsekwencji do zatrzymania różnicowania komórek, ich niepowstrzymanej proliferacji i zwiększonej apoptozy w większości przypadków (Walewski J et al., 2011 rozdział książki, Salaverria I et al., Blood 2014). W 70% przypadków sBL oraz postaci iBL, jak również w

40% eBL występują mutacje w genie kodującym czynnik transkrypcyjny *TCF3* (ang. *Transcription factor 3*) (modulujący geny aktywne w ośrodku rozmnażania) lub w genie kodującym jego negatywny regulator *ID3* (ang. *Inhibitor Of Differentiation 3*), który odpowiada za aktywację ścieżek receptora komórek B (ang. *B-Cell Receptor*, BCR) i kinazy 3-fosfoinozytolu (ang. *Phosphatidylinositol-3-Kinase*, PI3K), co między innymi, powoduje wzrost proliferacji komórek chłoniaka (*Salaverria I et al., Blood 2014*). Ogólnie, BL często wykazuje mutacje *MYC*, *TCF3*, *ID3* i *CCND3* (regulator cyklu komórkowego), *TP53*, *RHOA*, *SMARCA4* i *ARID1A*, oraz *GNA13* które aktywują ścieżkę *TCF3* (*Wagener R, et al., The mutational landscape of Burkitt-like lymphoma with 11q aberration is distinct from that of Burkitt lymphoma, Blood 2018*).

Przez wiele lat istniały wątpliwości czy istnieje BL bez rearanżacji *MYC*. Zgodnie z klasyfikacją WHO 2008 nowotworów układu chłonnego, od 5 do 10% przypadków BL nie wykazuje translokacji *MYC* lub też nie jest ona wykrywalna przy użyciu standardowych metod diagnostycznych (*Pieńkowska-Grela B i Rymkiewicz G et al., Med Oncol 2011, Salaverria I et al., Blood 2014, Rymkiewicz G et al., abstrakt Blood 2015*). Do momentu opublikowania aktualizacji klasyfikacji WHO 2017 nowotworów układu chłonnego nie istniały kryteria (złoty standard) diagnostyczne pozwalające na postawienie jednoznacznego rozpoznania *MYC-negative* BL (*MYC*⁻BL) w przypadku braku rearanżacji *MYC*. Wiele też prac opublikowanych dotyczących *MYC*⁻BL, stosujących jedynie *dual color break-apart probes* do wykluczenia rearanżacji *MYC*, nie wykluczyło ewentualnej insercji *MYC* w obrębie *IgH@* i vice versa lub odległego punktu pęknięcia w sąsiedztwie *MYC* do *IgH@*, co oznacza, brak możliwości traktowania takich przypadków, jako *MYC*⁻BL w świetle nowych poglądów dotyczących *cryptic insertion*. Zgodnie z ostatnim 2017 uaktualnieniem klasyfikacji WHO, przypadki wykazujące podobieństwo do BL bez translokacji *MYC*, a posiadające aberrację w obrębie długiego ramienia chromosomu 11, są włączane do nowej tymczasowej jednostki nozologicznej – chłoniaka podobnego do chłoniaka Burkitta z aberracją na długim ramieniu chromosomu 11, BLL,11q.

Cel pracy: Opisanie nowego podtypu chłoniaka podobnego do chłoniaka Burkitta z aberracją na chromosomie 11 (BLL,11q) bez rearanżacji *MYC* poprzez analizę kliniczną, patomorfologiczną, cytometryczną, cytogenetyczną i molekularną wszystkich dotychczas zdiagnozowanych przypadków BLL,11q wraz z oceną wyników leczenia tego bardzo rzadkiego podtypu chłoniaka w Centrum Onkologii-Instytut (COI) im. M. Curie-Skłodowskiej w Warszawie. Wszystkie przypadki BLL,11q były zdiagnozowane przez autora

Osiągnięcia Naukowe i traktowane/leczone w Centrum Onkologii - Instytucie, jako *MYC*⁻BL (od pierwszego chorego zdiagnozowanego w 2003, jako *MYC*⁻BL ze zmianą na 11q). Ponadto, skoncentrowałem się na przedstawieniu nowatorskiego algorytmu diagnostycznego opracowanego w Centrum Onkologii-Instytut przez autora „Osiągnięcia Naukowe”, umożliwiającego diagnostykę różnicową BLL,11q z BL i HGBL oraz DLBCL,NOS w ciągu 1,5 godziny.

Techniki diagnostyczne stosowane w rozpoznawaniu, scharakteryzowaniu i opisie BLL,11q:

- Obraz kliniczny zwykle pojedynczego guza w lokalizacji węzłowej na szyi lub w migdałku podniebiennym o charakterze *non-Bulky*, lub pojedynczego guza również często węzłowego w jamie brzusznej typu *Bulky* potwierdzonego w badaniach obrazowych (USG lub PET/CT), głównie u młodych mężczyzn,
- Badanie histopatologiczno-immunohistochemiczne (HP/IHC) materiałów uzyskiwanych dzięki biopsji chirurgicznej,
- Cytologia rozmazów (CYT) uzyskiwanych dzięki FNAB barwionych metodą May-Grunwald-Giemza i HE,
- Cytometria przepływowa (FCM), głównie trzy- lub czterokolorowa, komórek uzyskiwanych dzięki FNAB,
- Badania cytogenetyką klasyczną (CC) z oceną kariotypu - klasyczna metoda prążkowa, pozwalających na uchwycenie zmian morfologicznych w chromosomach metafazowych komórek uzyskiwanych dzięki FNAB,
- Badania FISH - umożliwiające, przy użyciu specyficznych sond DNA, precyzyjne określenie zmian obejmujących poszczególne chromosomy, ich części, bądź określone geny, tak w metafazach, jak i w jądrach interfazowych komórek uzyskiwanych dzięki FNAB,
- Badania molekularne z oceną ekspresji miRNA za pomocą zaawansowanych technik PCR (reverse transcription quantitative PCR, RT-qPCR) komórek uzyskiwanych dzięki FNAB,
- Badania cytogenetyki molekularnej z oceną submikroskopowych zmian liczby kopii obszaru 11q: duplikacyjnego (*gain*), jego amplifikacji i telomerycznej delecji (*losses*) z oceną utraty heterozygotyczności (ang. *loss of heterozygosity*, LOH) i disomii jednorodzielską (ang. *uniparental disomy*, UPD) za pomocą porównawczej hybrydyzacji genomowej do mikromacierzy z oceną polimorfizmu pojedynczych nukleotydów (aCGH/SNP), materiału uzyskiwanego dzięki FNAB lub z blozków parafinowych

(między innymi *array-based imbalance profiling applying the OncoScanTM CNF FFPE assay*). Zmiany zostały odwzorowane/zmapowane na ludzki genom referencyjny hg18 (*Salaverria I et al., Blood 2014*) lub hg19 (*Grygalewicz B et al., Am J Clin Pathol 2017, Wagener R et al., Blood 2018*),

- Badania molekularne sekwencjonowania DNA (ang. *whole exome sequencing*, WES) w technologii sekwencjonowania następnej generacji (ang. *Next Generation Sequencing*, NGS) materiałów z bloczków parafinowych. Bibliotekę zsekwencjonowano na „sekwencjonerze” Illumina HiSeq 4000 (Illumina) stosując protokół 2 x75 bp na końcu sparowanym.

Metody statystyczne obejmujące analizę przeżycia Kaplana – Meiera, test dokładny Fishera do mierzenia związków pomiędzy kategoriami zmiennych. Wartości $P < 0,05$, skorygowane za pomocą metody Benjaminiego-Hochberga, uznano za statystycznie istotne (ocena cytometryczna immunofenotypu BL i BLL,11q, oraz związek wielkości guza BLL,11q z amplifikacją regionu obejmującego gen *KMT2A*). Złożoność genetyczna była porównana między BL a BLL,11q za pomocą testu Kruskala-Wallisa, rangowanego test statystycznego. Test Manna-Whitneya zastosowano do porównań parami między seriami pacjentów z różnymi podtypami agresywnych chłoniaków. Do oceny różnic ekspresji miRNA dla więcej niż dwóch grup pacjentów wykorzystano test Kruskala-Wallisa. P-wartości zostały skorygowane do testowania wielu hipotez z algorytmem Benjaminiego-Hochberga. Aby określić, które zmienne najlepiej przewidują, do której grupy należy dana osoba, analiza dyskryminacyjna była wykonywana przy użyciu oprogramowania Statistica PL 6.0. Korelacje zostały zbadane za pomocą korelacji rang Spearmana współczynnik (r_s); Wartości p zostały obliczone przy pomocy AS89 algorytm.

OPIS WYNIKÓW I DYSKUSJA:

1) W publikacji [*Pienkowska-Grela B, Rymkiewicz G, Grygalewicz B, Woroniecka R, Krawczyk P, Czyż-Domanska K, Walewski J (2011). Partial trisomy 11, dup(11)(q23q13), as a defect characterizing lymphomas with Burkitt pathomorphology without MYC gene rearrangement. Med Oncol 2011;28(4):1589-1595*] przedstawiliśmy wyniki dotyczące odkrycia i diagnostyki bardzo agresywnych chłoniaków przypominających BL na poziomie badań HP/IHC i FCM z nielicznymi odmiennościami w badaniu cytometrycznym od klasycznych BL, ale bez rearanżacji *MYC* (przypadki te traktowaliśmy wtedy, jako BL, ale bez rearanżacji *MYC*, *MYC*⁻BL, zgodnie z obowiązującą wówczas klasyfikacją WHO 2008. W badaniach cytogenetycznych wykazaliśmy brak rearanżacji *MYC* (brak w kariotypie

translokacji a w badaniu FISH – kompletny *MYC* był zlokalizowany na obu chromosomach 8, co wykluczało ewentualną jego *cryptic insercję* - niewidoczną insercję w *IgH@*) i stwierdziliśmy powtarzalną zmianę obejmującą w kariotypie długie ramie chromosomu 11 (11q), opisaną głównie, jako duplikacja dup(11)(q23q13) w materiale pobranym za pomocy FNAB. W pracy wykazaliśmy poraz pierwszy na świecie immunofenotyp BLL,11q w badaniu FCM: CD45(+)/CD19(+)/CD20(+)/CD22(+)/CD10(+)/CD38(+)/CD43(+/-)/HLADR(+)/CD138(+)/CD16/CD56(+)/CD56(+)/CD52(+)/FMC7(+)/CD77(+)/kappa(+) lub lambda(+)/IgM(+)/CD71(+++) (na 100% komórek)/CD62L(-/+)/CD5(-)/CD11c(-)/CD23(-)/CD44(-)/BCL2(-) i TdT(-) zbliżony do BL oraz takie same cechy obu chłoniaków (BL i BLL,11q) w badaniu IHC: CD20(+)/CD10(+)/BCL6(+)/BCL2(-) /Ki67(+++, na 100% komórek).

Podkreślaliśmy, że rearanżacja *MYC*, która upodabnia morfologię różnych podtypów chłoniaków wzajemnie do siebie, nie jest swoista dla rozpoznania BL, ale występuje często w *B-cell lymphoma unclassifiable with features intermediate between DLBCL and BL*, DLBCL/BL (obecnie wg klasyfikacji WHO 2017 DLBCL/BL zostało zastąpione: HGBL,R i HGBL,NOS) i w części przypadków DLBCL,NOS, co utrudnia diagnostykę różnicową na poziomie badań HP/IHC. Dlatego 20-30% bardzo agresywnych chłoniaków była w tamtym okresie źle/niekompletnie rozpoznawana i nieadekwatnie leczona (zgodnie z dzisiejszą wiedzą) w większości ośrodków hemato-onkologicznych świata. Do scharakteryzowania dup(11)(q23q13) wykorzystaliśmy również sondy (DNA) FISH oceniające: centromer chromosomu 11 (CEN-11) oraz sondy umożliwiające detekcję zmian w obrębie pojedynczego genu np. *Dual color break-apart rearrangement probe* dla badania obecności rearanżacji locus *CCND1*, *MLL*, *ATM*, *MYC*, *IGH/CCND1*. Analiza kariotypu wykazała obecność jednego prawidłowego i jednego zmienionego chromosomu 11, początkowo identyfikowanego, jako marker dup(11q). Wielkość duplikacji została określona prążkami G w kariotypie na których ulokowane są geny: *CCND1* (11q13), *ATM* (11q22.3) i *MLL*(11q23.3) w stosunku do centromeru chromosomu 11. Na podstawie obecności do trzech w/w kopii genów w obu chromosomach 11 ustalono obszar w jakim dochodzi do dup(11q) (między *CCND1* (11q13.2) a *MLL* (obecnie gen oznaczamy jako *KMT2A*), (11q23.3), i obejmujący *ATM* (11q22.3)). Dodatkowo, analiza położenia w/w sygnałów na metafazach, w stosunku do centromeru chromosomu 11, uwidoczniała, że doszło do inwersji zduplikowanego fragmentu chromosomu 11. Prawidłowa sekwencja genów na normalnym chromosomie 11 jest następująca: pter—CEN-11—*CCND1*—*ATM*—*MLL*—qter. W opisanym wyżej markerze dup(11q) kolejność genów była co najmniej raz podwojona i odwrócona w

sekwencji: pter—CEN-11—CCND1—ATM—MLL—MLL—ATM—CCND1—qter.

Ponadto, zaobserwowaliśmy dwa typy duplikacji z amplifikacją obszaru obejmującego *MLL* (obecnie zmiana nazwy genu *MLL* na *KMT2A*) lub bez tej amplifikacji.

Reasumując, najważniejszym wynikiem badania było wykazanie:

- **Odkrycie i potwierdzenie istnienia chłoniaka zbliżonego klinicznie i patomorfologicznie (na poziome badań klinicznych, HP/IHC i FCM) do chłoniaka Burkitta bez rearanzacji *MYC*.**
- **Wykazanie istnienia zmiany genetycznej na długim ramieniu chromosomu 11 obejmującą duplikację fragmentu chromosomu z towarzyszącą inwersją zduplikowanego fragmentu chromosomu 11 w chłoniakach podobnych do BL bez rearanzacji *MYC*, którą można zidentyfikować po zastosowaniu kilku sond FISH.**

2) W publikacji [Salaverria I, Martin-Guerrero I, Wagener R, Kreuz M, Kohler CW, Richter J, Pienkowska-Grela B, Adam P, Burkhardt B, Claviez A, Damm-Welk C, Drexler HG, Hummel M, Jaffe ES, Küppers R, Lefebvre C, Lisfeld J, Löffler M, Macleod RA, Nagel I, Oschlies I, Rosolowski M, Russell RB, **Rymkiewicz G**, Schindler D, Schlesner M, Scholtysik R, Schwaenen C, Spang R, Szczepanowski M, Trümper L, Vater I, Wessendorf S, Klapper W, Siebert R (2014). A recurrent 11q aberration pattern characterizes a subset of *MYC*-negative high-grade B-cell lymphomas resembling Burkitt lymphoma. *Blood* 2014;123(8):1187-1198] zidentyfikowano 59 przypadków BL za pomocą 2 istniejących «niezależnych od siebie» i opublikowanych wcześniej klasyfikatorów profilowania ekspresji genów w chłoniaku Burkitta [*the molecular-BL (mBL) index* i *the BL-pathway activation pattern (BL-PAPclassifier)*] wśród 753 chłoniaków B-komórkowych zidentyfikowanych molekularnie dzięki projektowi sieci *Molecular Mechanisms in Malignant Lymphoma Network Project; Berlin-Frankfurt-Münster Non-Hodgkin Lymphoma Group*. Tylko 2/59 (3%) przypadków molekularnych BL nie miało translokacji *MYC*, ale posiadały aberrację 11q, która charakteryzowała się powieleniem materiału genetycznego (który odpowiada wcześniej opisanej przez nas duplikacji) w obrębie locus 11q23.2-q23.3 i telomerycznej delecji (*telomeric losses*) obejmującą 11q24.1-qter. Minimalny region powielenia określony jako *high-level amplifications* w regionie 11q23.3 był związany z nadekspresją genów o funkcji onkogenów (w tym *PAFAH1B2* na poziomie transkryptu i białka). Powtarzalny region delecji terminalnej (z utratą genów supresorowych) obejmował delecję homozygotyczną w regionie 11q24.2-q24.3 obejmującym *ETSI*, gen zmutowany w 4 na 16 analizowanych przypadków. Podobnie w/w pracy z grupy Prof. Włodarskiej „*Post-transplant molecularly defined Burkitt*

lymphomas are frequently MYC-negative and characterized by the 11q-gain/loss pattern” potwierdzono nadekspresję *USP2*, *CBL* and *PAFAH1B2* znajdujące się w obszarze zduplikowanym 11q23.3 oraz spadek ekspresji *TBRG1*, *EI24* i *ETS1* wynikający z delecji terminalnej regionu 11q24q25. Te obserwacje potwierdziły istnienie molekularnie scharakteryzowanego podtypu chłoniaka z komórek B, przypominającego BL, który charakteryzuje się deregulacją genów zlokalizowanych na 11q.

Zmienność liczby kopii (ang. *Copy Number variation*, CNV) i analiza mutacji:

W zależności od materiału (świeży materiał vs materiał w bloczkach parafinowych) zastosowano różne platformy oceny zmienności liczby kopii (z równoczesną oceną mutacji) [*GeneChip Mapping SNP 6.0 array* do świeżego materiału i linii komórkowych] a dla materiału z bloczków parafinowych [*Agilent Human CGH Microarray*] (analiza CNV zdeponowana pod numerem GSE47508 w *Gene Expression Omnibus*, GEO). Złożoność genetyczna została określona za pomocą liczby obserwowanych CN aberacji na przypadek. Analiza porównująca *MYC-positive* i *MYC-negative* BL ujawnił 708 i 266 genów różniących oba podtypy BL odpowiednio za pomocą w/w klasyfikatorów profilowania ekspresji genów (mBL i BL-PAP). *MYC* miał znacząco niższą ekspresję, na poziomie transkryptu, w *MYC*⁻BL, zarówno w klasyfikatorze mBL i BL-PAP, w porównaniu z ich odpowiedników *MYC*-dodatnich.

Wyniki cytogenetycznej i mikromacierzowej charakterystyki aberracji na chromosomie 11 w BLL,11q:

- morfologiczne podobieństwo do BL, mimo braku rearanżacji *MYC* (obraz gwiazdzistego nieba, bardzo liczne figury podziału i nieliczne limfocyty T w nacieku),
- immunofenotypowe podobieństwa do BL CD20(+)/CD10(+)/BCL2(-), z indeksem Ki67 zbliżonym do 100%),
- brak wirusa Epstein-Barr wbudowanego do materiału genetycznego komórek BLL,11q,
- brak translokacji charakterystycznych dla BL i innych w tym t(14;18)/*BCL2*,
- cytogenetycznie, zmiana w 5/9 przypadków została opisana jako inwersja duplikacji dup11q13-q23,
- dodatkowo, stwierdzono powtarzalne zmiany na innych chromosomach 6q14-q24 i 18q21-q22 w BLL,11q,
- ekspresja białka *MYC* była 1,9 razy niższa w przypadkach BLL,11q niż w przypadkach BL.

Reasumując, najważniejszym wynikiem badań było wykazanie:

- **Potwierdzenie istnienia chłoniaków *MYC*-negative o profilu ekspresji genów zbliżonych do *MYC*-positive BL.**
- **Szczegółowe scharakteryzowanie aberracji 11q na poziomie molekularnym jako powielenie fragmentu ramienia długiego chromosomu 11q z jego telomeryczną utratą, co mogłoby odpowiadać dodatkowym kopiom onkogenów i ich aktywacji we fragmencie zduplikowanym i utracie genów supresorowych z fragmentu ulegającemu delecji.**

3) W publikacji [Zajdel M, Rymkiewicz G, Chechlińska M, Blachnio K, Pienkowska-Grela B, Grygalewicz B, Goryca K, Cieslikowska M, Bystydziński Z, Swoboda P, Walewski J, Siwicki JK (2015). *miR expression in MYC-negative DLBCL/BL with partial trisomy 11 is similar to classical Burkitt lymphoma and different from diffuse large B-cell lymphoma. Tumour Biol 2015;36:5377-5388*] ocenialiśmy użyteczność metody oceny mikroRNA w diagnostyce różnicowej bardzo agresywnych chłoniaków z limfocytów B, w tym BLL,11q. MikroRNA (miRNA, miR), czyli krótkie niekodujące cząsteczki kwasu rybonukleinowego od lat budzą duże nadzieje jako potencjalne biomarkery diagnostyczne. miRNA wpływają na różnicowanie limfocytów i kształtują określone cechy fenotypowe poprzez wpływ na ekspresję określonych grup genów. Określone profile ekspresji miRNA różnicują (tak jak immunofenotyp, zmiany cytogenetyczne i profil ekspresji genów) różne podtypy chłoniaków B-komórkowych. Zatem poszukiwanie markerów diagnostycznych wśród cząsteczek miRNA znajduje racjonalne uzasadnienie. Dlatego też, niezwykle przydatne byłoby znalezienie nowych markerów ułatwiających precyzyjne i szybkie różnicowanie BL vs BLL,11q vs HGBL vs DLBCL,NOS, niezależnie od potwierdzenia lub braku rearanzacji *MYC*. Liczne przesłanki literaturowe wskazują na możliwość rozszerzenia algorytmów diagnostycznych bardzo agresywnych chłoniaków B-komórkowych o ocenę profili ekspresji miRNA. Celem pracy była ocena przydatności miR-155, miR-21 i miR-26a i analiza dwóch genów regulowanych przez miR-155: czynnika transkrypcyjnego *PU.1* i deaminazy indukowanej aktywacją, *AID*. Ponadto, scharakteryzowano klinicznie i patologicznie chorych z BLL,11q (największą dotychczas grupą chorych z BLL,11q opublikowaną na świecie, diagnozowaną za pomocą tego samego algorytmu) i BL (oraz z DLBCL,NOS) i wykazano różnice epidemiologiczno-kliniczne. Materiał kliniczny stanowiło 102 próbek pacjentów diagnozowanych przez autora Osiągnięcia Naukowego i/lub leczonych w Centrum Onkologii – Instytucie im. Marii Skłodowskiej – Curie w Warszawie w latach 2003–2014. Materiał stanowiły aspiraty komórkowe uzyskane metodą FNAB bogate w komórki nowotworowe

>70%. Ostateczne rozpoznanie bardzo agresywnych podtypów chłoniaków zostało ustalone przez autora Osiągnięcia Naukowego zgodnie z klasyfikacją WHO z 2008 roku, z uwzględnieniem zmian wprowadzonych do uaktualnienia klasyfikacji w 2017 roku (dla potrzeb Osiągnięcia Naukowego), na podstawie prezentacji klinicznej choroby oraz szerokiej diagnostyki, która obejmowała badania HP/IHC, FNAB/FCM/CC/FISH (50 przypadków DLBCL,NOS, 37 - BL, 12 - BLL,11q oraz 8 - HGBL). W badaniach FCM/IHC uwzględniono bardzo szeroki panel przeciwciał. Badania cytogenetyczne objęły ocenę kariotypu metodą prążkową i ocenę rearanżacji genów metodą FISH: między innymi poszukiwanie rearanżacji genu *MYC* oraz ocena statusu genów *IGH*, *BCL2* i *BCL6*, jak również *CCND1*, *ATM*, *KMT2A*. Dodatkowo, w celu oceny inwersji obszaru zduplikowanego na 11q oraz delecji terminalnej, oceniano odpowiednio za pomocą FISH: CEP11 i D11S1037.

Charakterystyka grupy pacjentów z rozpoznaniem BL:

Chorzy z rozpoznaniem BL (n=37) stosunek M:F jak 2,7:1, w wieku 18–75 lat (mediana=36 lat). 19 próbek (51%) pobrano z węzłów chłonnych, a 18 (49%) z lokalizacji pozawęzłowych (stosunek lokalizacji pozawęzłowych do węzłowych około 1:1). Badania IHC i FCM wykazały immunofenotyp BL:

1/ bardzo wysoką ekspresję CD20 (36/37 przypadków); 2/ w zdecydowanej większości fenotyp BCL2 (-) (32 przypadki), w pozostałych śladowy odczyn BCL2 na części komórek nowotworowych, ale wielokrotnie słabszy niż na limfocytach T; 3/ CD10 (+) (36 na 37 przypadków), większość przypadków BCL6(+); 4/ wysoki indeks proliferacyjny, wyrażonym silnym odczynem Ki67 na prawie wszystkich komórkach (>95%) i wysoką ekspresją CD71 (zawsze na 100% komórek - wszystkie przypadki); 5/ nadekspresją antygenu CD38 (CD38^{higher}) w stosunku do prawidłowych limfocytów T; oraz 6/ brakiem ekspresji CD3, CD5, TdT i CD34 (wszystkie przypadki).

Ponadto, rozpoznanie BL było potwierdzone za pomocą „simple” lub „low complex karyotype” oraz badaniem FISH z potwierdzeniem rearanżacji *MYC* bez rearanżacji *BCL2* i *BCL6* przy użyciu sond *break-apart*.

Charakterystyka grupy pacjentów z rozpoznaniem BLL,11q (opisywanej w pracy jako BNHLs[11q]):

Chorzy z rozpoznaniem BLL,11q (n=12), stosunek M:F jak 11;1, w wieku 18–62 lata (mediana=27). 7 próbek pobrano z węzłów chłonnych + 3 migdałki, a 2 ze zmian pozawęzłowych (stosunek lokalizacji pozawęzłowych do węzłowych około 5;1). Badania IHC i FCM wykazały immunofenotyp BLL,11q:

1/ bardzo wysoką ekspresją CD20(+); 2/ były BCL2(-) (11 z 12 przypadków; jeden przypadek z bardzo słabą/sładową ekspresją BCL2); 3/ we wszystkich przypadkach BCL6(+)/CD10(+)/CD38(+); 4/ wysokim indeksem proliferacyjnym, z wysokim odczynem Ki67 na prawie wszystkich komórkach (>95%) i wysoką ekspresją CD71 (na 100% komórek); 5/ wysoką ekspresją antygeny CD38 porównywalną z ekspresją na limfocytach T, ale niższą niż w BL; 6/ brakiem ekspresji CD3, CD5, TdT i CD34 (wszystkie przypadki).

Ponadto, rozpoznanie BLL,11q było potwierdzone za pomocą „simple” lub „low complex karyotype” oraz badania FISH z potwierdzeniem braku rearanżacji *MYC*, *BCL2* i *BCL6* oraz powtarzalnej zmiany na 11q.

Klinicznie, porównując BLL,11q z BL wykazaliśmy:

- Podobieństwo w prezentacji klinicznej między BLL,11q a BL w postaci jednego guza, czasami w postaci dwóch sąsiadujących zmian (brak rozsiewu choroby podczas pierwotnej diagnostyki we wszystkich przypadkach BLL,11q).
- Znacznie częstsze zajęcie węzłów chłonnych i migdałka w BLL,11q niż w BL z częstszą prezentacją pozawęzłową.
- Znacząca przewaga przypadków BLL,11q u młodych mężczyzn z medianą 27 lat wśród chorych z COI w Warszawie (w BL mamy trzy piki zachorowalności u bardzo młodych dorosłych i nastolatków/dzieci (główna grupa), około 40 roku życia (drugi szczyt zachorowalności) i koło 70-80 roku życia. Można postawić hipotezę, że wzór częstości trójpicowej zachorowalności BL odzwierciedla heterogenną etiologię/biologię BL w porównaniu do BLL,11q (choroba bardziej jednopikowa, homogenna), choć przypadki pediatryczne BLL,11q są również opisywane przez innych autorów (*Salaverria I et al., Blood 2014*, *Wagener R, et al., Blood 2018*) oraz powstałe na podłożu wtórnych niedoborów immunologicznych (*Wagener R, et al., Blood 2018*, praca z zespołu Profesor Iwony Włodarskiej: „*Post-transplant molecularly defined Burkitt lymphomas are frequently MYC-negative and characterized by the 11q-gain/loss pattern*”, *Haematologica 2015*)
- Stosunek mężczyzn do kobiet w BLL,11q wyniósł 11:1 a w przypadku BL 2,7:1.
- Brak wbudowanego materiału genetycznego wirusa EBV w komórki BLL,11q w przeciwieństwie do przypadków BL, w których reakcja EBER jest często dodatnia, nawet do 35% przypadków trzech wariantów epidemiologicznych.
- Brak cech zajęcia szpiku czy płynu mózgowo-rdzeniowego przez komórki BLL,11q w przeciwieństwie do przypadków BL, w których szpik jest częściej zajmowany,

szczególnie w przypadkach pediatrycznych i iBL (przypadki pediatryczne BLL,11q z zajęciem szpiku opisane w *Wagener R, et al., Blood 2018*).

- Podobieństwo morfologiczne i immunofenotypowe w badaniach IHC (CD20(+)/CD10(+)/BCL6(+)/BCL2(-)/Ki67>95%) obu podtypów chłoniaków z dyskretnymi różnicami cytometrycznym w zakresie fenotypu (CD38^{higher} vs CD38+).
- Podobieństwo przebiegu klinicznego BL i BLL,11q w przypadku stosowania schematów leczenia dla BL z uzyskaną krzywą plateau przeżycia (w tym brak nawrotu po zakończeniu leczenia).
- Zarówno BLL,11q jak BL, charakteryzują się znamienne statystycznie niższym poziomem ekspresji miR-155/BIC, miR-21, and miR-26a (podobieństwo na poziomie miRs) w porównaniu do grupy DLBCL,NOS.

Reasumując, najważniejszym wynikiem badań było:

- **Podobny poziom ekspresji miRs w BL i BLL,11q (ale inny niż w DLBCL,NOS) sugeruje wspólną wyjściową komórkę (*cell of origin*) ośrodków rozmnażania, z której powstaje BL i BLL,11q, a w łączności z podobieństwami kliniczno-patomorfologicznymi (ale i pewnymi różnicami epidemiologicznymi i w prezentacji klinicznej) między klasycznym *MYC*⁺BL a *MYC*⁻BLL,11q należy uznać większość opisanych przez nas przypadków BLL,11q za wcześniej opisywane przypadki BL bez rearanżacji *MYC*.**

4) W publikacji [*Grygalewicz B, Woroniecka R, Rymkiewicz G, Rygier J, Borkowska K, Kotyl A, Blachnio K, Bystydziński Z, Nowakowska B, Pienkowska-Grela B (2018). The 11q-gain/loss aberration occurs recurrently in MYC-negative Burkitt-like lymphoma with 11 q aberration as well as MYC-positive Burkitt lymphoma and MYC-positive high grade B cell lymphoma NOS. Am J Clin Pathol 2018*] podsumowaliśmy, że zmiana opisana jako duplikacja z inwersją długiego ramienia 11q wraz z jego telomeryczną delecją nie jest specyficzna dla rozpoznania BLL,11q, ale występuje jako dodatkowa zmiana w części BL z rearanżacją *MYC* jak również w części przypadków HGBL i DLBCL,NOS. W tym opracowaniu przedstawiliśmy 11 nowych, wcześniej niepublikowanych, przypadków chłoniaków (6 przypadków BLL,11q, 3 przypadki *MYC*⁺,11q⁺BL, i 2 przypadki HGBL,NOS) ze specyficzną *11q-gain/loss aberration*. Za pomocą CC/FISH/aCGH/SNP potwierdziliśmy, że zmiana na 11q obejmuje równoczesną dup/inv/del (*critical set of 11q aberration*). Za pomocą aCGH/SNP (zastosowano platformę oceny zmienności liczby kopii *CytoSure*

Haematological Cancer and SNP Array (8x60k) (Oxford Gene Technology [OGT] Yarnton, UK) do świeżego materiału i wykazaliśmy dwa typy dup: większą >50 Mb i mniejszą <20 Mb. Mniejsza „dup” korelowała z guzami typu *Bulky* >20cm i amplifikacją regionu 11q23.3, w którym znajduje się *KMT2A*. Ponadto, stwierdziliśmy alternatywną zmianę molekularną dla delecji terminalnej pod postacią disomii jednorodzielskiej, UPD.

W badanych przypadkach:

- We wszystkich przypadkach uzyskaliśmy kariotyp (1 *simple karyotype*, w pozostałych głównie „*low complex karyotype*” ale w stosunku do BL, kariotyp był bardziej skomplikowany, „*more complex karyotype than BL*”).
- Wszystkie przypadki charakteryzował się duplikacją, ale jej wielkość była różnorodna: największa między prążkami: 11q12.1 i 11q24.3 a najmniejsza między 11q22.3 i 11q24.1;
- Wzajemny stosunek sygnałów *CCND1*, *ATM* i *KMT2A* na aberentnym chromosomie 11 potwierdził inwersję w powielonym regionie.
- Delecja telomeryczna była oceniana również za pomocą sondy D11S1037(11q25).
- Rearanżacja *MYC* obejmująca t(8q24), została potwierdzona w 5 przypadkach zdiagnozowanych jako BL z rearanżacją *MYC* z równoczesną aberracją 11q, w żadnym z 11 przypadków nie potwierdzono rearanżacji *BCL2* i *BCL6*.

Porównawcza hybrydyzacja genomowa do mikromacierzy z oceną polimorfizmu pojedynczych nukleotydów (aCGH/SNP) umożliwiła ocenę:

* 2 głównych typów aberracji 11q:

- Z większą duplikacją 11q (>50 Mb), której towarzyszyła delecja terminalna. Większa duplikacja została wykryta u 6 chorych a regiony duplikacyjne obejmowały region od 71,39 Mb (11q12.1q24.3) do 51,27 Mb (11q13.4q24.1). i,
- z mniejszą duplikacją 11q (<20 Mb) z dodatkową amplifikacją w fragmencie zduplikowanym, także z delecją terminalną. Mniejszą duplikację opisano u 4 chorych a regiony duplikacyjne obejmowały region od 11,95 Mb (11q22.3q24.1) do 18,97 Mb (11q22.2q23.3). Najmniejsza duplikacja obejmowała około 12 Mb. We wszystkich przypadkach stwierdziliśmy multiplikację obejmującą region od 1,46 Mb do 5,26 Mb. Najmniejsza amplifikacja obejmowała 48 genów, między innymi *KMT2A*. Amplifikacja była znamienne statystycznie związana z małą duplikacją ($P=0.005$) i z guzem typu *Bulky* o największym wymiarze powyżej 20 cm ($P=0.033$). Szczególnie guzy *Bulky* występowały w przestrzeni zaotrzewnowej sugerując, że amplifikacja regionu 11q jest elementem progresji genetycznej guza w obszarach (przestrzeń zaotrzewnowa), gdzie

mały i średniej wielkości guz jest zwykle niewykrywalny i diagnostyka dotyczy zwykle guzów znacznie większych niż w lokalizacjach powierzchniowych (węzły szyi, migdałek).

- W 2 przypadkach (z rozpoznaniem HGBL i BL a nie BLL,11q!!!) wielkość delecji terminalnej była większa niż w pozostałych przypadkach i obejmowała regiony odpowiednio 21,09 Mb (11q23.2q25) i 17,97 Mb (11q23.3q25). W tych przypadkach delecja terminalna obejmowała *KMT2A*. Mimo, że *KMT2A* bardzo często występuje w regionie amplifikowanym to znalezienie 2 przypadków, w których doszło do delecji tego genu powinno wykluczyć ten gen, jako kandydata odpowiedzialnego za powielenie (duplikację) 11q, ale nie można wykluczyć, że w tych przypadkach, nienależących do BLL,11q, zmiany w obrębie 11q są wtórne do rearanżacji *MYC* i nie należy tak dużej delecji terminalnej z *KMT2A* traktować jako swoistej dla BLL,11q.
- Delecję terminalną (monoaleliczną) stwierdziliśmy w 10/11 przypadków. Wielkość tej delecji była różnorodna ale minimalny region utraty (ang. *minimal lost region*, MLR) wynosił 6.75Mb i był zlokalizowany na 11q24.4q25 (Chr11:128.177.670-134.931.948). W jednym przypadku stwierdziliśmy delecję terminalną bialleliczną wielkości 774 kb zlokalizowaną na 11q24.3 (Ch11. 128.039.399-128.813.918) i obejmującą utratę genów: *ETS1*, *FLII*, *KCNJ1*, *KCNJ5*, *C11orf45* i *TP53AIP1*. Ten przypadek może potwierdzać wcześniejszą naszą obserwację (*Salaverria I et al., Blood 2014*) o roli, jaką mogą spełniać *ETS1*, *FLII* w patogenezie BLL,11q jako geny supresorowe (ich utrata w terenie bialleliczną delecji terminalnej).
- W 9 przypadkach równocześnie analiza SNP wykazała utratę heterozygotyczności (LOH) we fragmencie, który uległ terminalnej delecji.
- Nietypowo, u jednego pacjenta z BLL,11q nie wykryliśmy delecji terminalnej 11q, natomiast wykazaliśmy u niego za pomocą mikromacierzy opartych na analizie polimorfizmu pojedynczego nukleotydu (aSNP) disomię jednorodzicielską (UPD) regionu terminalnego 11q24.1q25 (który zwykle ulega delecji terminalnej). UPD jest mechanizmem, w którym dochodzi do eliminacji kopii fragmentu DNA i zastąpienia go pozostałą kopią DNA, zwykle z mutacjami lub dezaktywacją genów recesywnych, co jest również odpowiedzialne za wykrycie utraty heterozygotyczność z zachowaniem liczby kopii genu (ang. *a copy number neutral loss of heterozygosity*, CN-LOH). Ta delecja genu/ów supresorowych jest najprawdopodobniej odpowiedzialna za promocję rozwoju chłoniaków typu BLL,11q. Mechanizm UPD eliminuje niezmutowane geny supresorowe

BLL,11q i zastępuje je kopiami zmutowanych genów (CN-LOH jest mechanizmem chromosomowym, w wyniku którego homozygotyczne mutacje mogą być nabywane w rozwoju procesu nowotworowego, szczególnie w nowotworach hemato-onkologicznych). Występowanie nabytego CN-LOH (ang. *acquired CN-LOH*) w określonych regionach chromosomów może wskazywać lokalizację genów z nabytymi, homozygotycznymi mutacjami genu, w tym przypadku CN-LOH 11q: *ETS1* i/lub *FLII*).

Reasumując, najważniejszym wynikiem badań było:

- Wykazanie, że niedawno opisana zmiana cytogenetyczna: ***11q-gain/loss aberration*** występująca w BLL,11q nie jest patognomoniczna dla tego podtypu chłoniaka, ale występuje w części przypadków BL, HGBL i być może DLBCL.
- Jeden przypadek, w którym nie wykryto delecji 11q za pomocą analizy aSNP i FISH wykazał disomię jednorodzielską (UPD) krytycznego regionu terminalnego 11q24.1q25. Uważamy, że UPD w tym przypadku może być alternatywnym zdarzeniem genetycznym do końcowej delecji, co może skutkować równoważnym efektem molekularnym.

5) W pracy [**Rymkiewicz G, Grygalewicz B, Chechlinska M, Blachnio K, Bystydziński Z, Romejko-Jarosinska J, Woroniecka R, Zajdel M, Domanska-Czyz K, Martin-Garcia D, Nadeu F, Swoboda P, Rygier J, Pienkowska-Grela B, Siwicki JK, Prochorec-Sobieszek M, Salaverria I, Siebert R, Walewski J (2018). A comprehensive flow-cytometry-based immunophenotypic characterization of Burkitt-like lymphoma with 11q aberration. *Mod Pathol* 2018; 31(5): 732–743**] wykazaliśmy bardzo duże podobieństwo morfologiczne BLL,11q do BL, zwracając uwagę na często obserwowaną zmniejszoną ilość makrofagów obładowanych ciałkami apoptotycznymi (zredukowany *Starry sky appearance*) w stosunku do postaci klasycznych BL oraz unikalny immunofenotyp BLL,11q w stosunku do BL w badaniu IHC i FCM. Mimo licznych podobieństw immunofenotypowych wykazaliśmy również znamienne statystyczne cechy różniące oba podtypy chłoniaka Burkitta. Materiał diagnostyczny pochodził z 33 biopsji cienkoigłowych i równoległych badań histopatologicznych z materiału pobranego drogą chirurgiczną spośród 82 chorych z rozpoznaniem BL, których zdiagnozowałem w latach 2003-2014 w Centrum Onkologii – Instytucie. Spośród 33 chorych rozpoznałem 10 przypadków BLL,11q [9M/1F, mediana wieku 27(18-62) HIV/EBV negatywni] i 23 przypadki sBL [19M/4F, mediana wieku 35 (18-63), HIV negatywni], w tym trzy przypadki BL z równoczesną rearanzacją *MYC* i aberracją 11q. Porównaliśmy IHC BL z BLL,11q i wykazaliśmy odczyny IHC na komórkach BLL,11q: CD20(+)/CD10(+)/BCL6(+)/

BCL2(-)/MUM1(-)/MYC(+)/EBV(-), zwykle LMO2(+)/CD44(-)/CD43(-) i czasami CD56(+), z bardzo wysokim indeksem Ki67(+++) na poziomie 100%. Immunohistochemicznie, w stosunku do BL, komórki BLL,11q różniły się odczynami IHC: LMO2, CD43 i CD56 oraz EBV. Cytometrycznie, w stosunku do komórek BL, komórki BLL,11q różniły się znamienne statystycznie w zakresie: częstszej ekspresji CD38^{higher} w BL (91% BL vs 10% BLL,11q), częstszego spadku ekspresji CD45 w BL (74% vs 10%), i wyłącznej CD16/CD56 oraz bardzo ograniczonej ekspresji CD8 w BLL,11q (odpowiednio 60% vs 0% i 40% vs 4%). Ponadto, wykazaliśmy znacznie częstszy, znamienne statystyczny, typ koekspresję CD43 na wszystkich lub na części komórek BL w stosunku do rzadszej koekspresję CD43 na wszystkich komórkach BLL,11q. Wykazaliśmy bardzo dużą dokładność i skuteczność diagnostyczną cytometrii FCM w obu podtypach chłoniaka Burkitta. Ekspresja cytometryczna CD16/CD56 bez CD38^{higher} i brak ekspresji CD16/CD56 z CD38^{higher} jest wiarygodną, szybką i taną metodą oceny odpowiednio aberracji 11q i rearanzacji *MYC* w agresywnych CD10(+)/BCL2(-) chłoniakach B-komórkowych. Ponadto, zaproponowaliśmy algorytm diagnostyczny poszerzony o badania IHC ułatwiający szybką i prostą identyfikację przypadków podejrzanych o aberrację 11q i rearanzację *MYC* oparty na strategii oceny cytometrycznej ekspresji CD16/CD56 i CD38 oraz oceny IHC: LMO2/CD56, które wydają się bardzo obiecujące w rutynowej diagnostyce różnicowej agresywnych chłoniaków CD10(+)/BCL2(-). W latach 2003-2014 wszystkie przypadki BLL,11q, traktowane jako *MYC*-BL, leczono w COI schematami immunochemioterapii (GMALL/B-ALL/NHL 2002, R-CODOX-M/IVAC) stosowanymi w chłoniaku Burkitta. Spośród 10 chorych z BLL,11q ośmiu uzyskało całkowitą remisję a ich krzywa (analiza) 5-letniego przeżycia Kaplana-Meiera (prawdopodobieństwo przeżycia) osiągnęło *plateau*, co jest typowe dla chłoniaka Burkitta (nie występuje w innych chłoniakach) i wyniosło 80% przy medianie obserwacji 54 miesięcy (zakres od 0 do 134 miesięcy) (5 letnie OS 80% [95% przedział ufności (55%,100%)]). Dodatkowo, scharakteryzowaliśmy obraz kliniczno-patologiczny BLL,11q i porównaliśmy go do obrazu BL. Wykazaliśmy, między innymi, że BLL,11q u osób dorosłych (w przeciwieństwie do przypadków pediatrycznych i związanych z niedoborami immunologicznymi) nie zajmują krwi, szpiku i płynu mózgowo-rdzeniowego i wszystkie nasze przypadki są EBV(-)/HIV(-) (pojawiły się opublikowane ostatnio przypadki BLL,11q u chorych na AIDS (*acquired immunodeficiency-related* BLL,11q?) oraz wcześniej opisano przypadki po transplantacyjne BLL,11q (*post-transplant* BLL,11q). Według naszych szacunków BLL,11q jest bardzo rzadkim chłoniakiem i stanowi około 12% wszystkich

chłoniaków spełniających większość patomorfologicznych kryteriów diagnostyki BL (W Polsce notuje się od 50 do 120 nowych zachorowań na BL rocznie, co może oznaczać średnio od 6 do 15 przypadków BLL,11q rocznie w Polsce). Analiza CNV została zdeponowana pod numerem GSE93002 w *Gene Expression Omnibus*, GEO).

Reasumując, najważniejszym wynikiem badań było:

- Wykazanie wysokiej skuteczności biopsji cienkoigłowej jako metody uzyskiwania materiału diagnostycznego do badań cytometrycznych, kariotypu, FISH i badań molekularnych w BLL,11q i BL.
- Wykazanie dużych podobieństw morfologicznych w badaniu cytologicznym uzyskanym dzięki FNAB i histopatologicznym w BLL,11q i BL, często z zredukowaniem “obrazu gwiazdzistego nieba” lub większego pleomorfizmu komórek BLL,11q, ale obie cechy są niewystarczające do różnicowania obu potypów BL.
- Zdefiniowanie cech immunofenotypowych w badaniach FCM/IHC, umożliwiających diagnostykę różnicową BLL,11q i BL w rutynowej diagnostyce patomorfologicznej.
- Zaproponowanie praktycznego algorytmu diagnostyki różnicowej między BLL,11q a BL za pomocą cytometrii przepływowej i immunohistochemii.
- Wykazanie istotnych różnic statystycznych pomiędzy BLL,11q i BL w ekspresji CD16/CD56/CD38/CD45/CD8/CD43 dzięki cytometrii przepływowej i CD43/LMO2/CD56 za pomocą badań immunohistochemicznych, co ułatwia diagnostykę różnicową.
- Ponowne potwierdzenie odwróconej duplikacji części długiego ramienia chromosomu 11 z mono- lub bialleliczną utratą telomerową 11q, jako powtarzalnej aberacji 11q.
- Pelen opis kliniczno-patologiczny przypadków BLL,11q i porównanie go z obrazem BL.
- Według naszych obserwacji intensywne immunochemioterapie programami lekowymi stosowanymi w leczeniu BL umożliwia uzyskiwanie pełnej remisji u 80% chorych, u których nie obserwowaliśmy nawrotu choroby a krzywa przeżycia osiągnęła *plateau*, co jest typowe dla BL.

6) W pracy Wagener R, Seufert J, Bens S, Kleinheinz K, Nagel I, Altmüller J, Thiele H, Hübschmann D, Kohler ChW, Nürnberg P, Au-Yeung R, Burkhardt B, Horn H, Leoncini L, Jaffe ES, Ott G, Rymkiewicz G, Schlesner M, Klapper W, Siebert R (2018). *The mutational landscape of Burkitt-like lymphoma with 11q aberration is distinct from that of Burkitt*

lymphoma Blood 2018; doi.org/10.1182/blood-2018-07-864025, zbadaliśmy 15 pacjentów z BLL,11q (w tym aż 53% przypadków pediatrycznych, których w COI nie diagnozujemy), głównie o prezentacji węzłowej, z jednym nietypowym przypadkiem 10-letniego pacjenta z zajęciem szpiku kostnego (wśród naszych 19 dorosłych chorych z aberracją 11q nigdy nie obserwowano zajęcia BM), u którego równocześnie stwierdzono wrodzone niedobory immunologiczne. Mediana wieku w momencie rozpoznania wynosiła 15,5 (zakres 4-52), a stosunek M do F wyniósł 2,75: 1 (również nietypowy dla dorosłych chorych z COI, gdzie stosunek „M” do „F” oscylował jak 10 do 1). U dwóch chorych stwierdzono kliniczne niedobory odporności (10-letni chory jak wyżej i 52-letni chory po przeszczepie narządowym). Analizując zmiany liczby kopii obszaru 11q (*array-based imbalance mapping*) i sekwencjonowanie całego exome-u (WES) zidentyfikowaliśmy:

- kompleks INO80 genu *NFRKB* (locus 11q24.3) jako kandydata patogenetycznego BLL,11q. Na potwierdzenie tej teorii znaleźliśmy w 15 osobowej grupie BLL,11q, dwa przypadki BLL,11q z *non-critical set of 11q aberration*, z obecnością wyłącznie del terminalnej bez dup/inv, co mogłoby oznaczać, że za rozwój BLL,11q w pierwszej kolejności może odpowiadać wyłącznie inaktywacja *NFRKB*.
- 47 genów z powtarzającym się mutacjami zmieniającymi białko.
- Nie stwierdziliśmy swoistych dla *MYC*⁺BL powtarzalnych mutacji w genach osi ID3-TCF3 (*MYC, ID3, TCF3, TP53, SMARCA4 and GNAI3*) lub kompleksu SWI/ SNF ani charakterystycznych dla chłoniaków wywodzących się z ośrodków/centrów rozmnażania (DLBCL,NOS, GCB/FL) mutacji w genach jak *KMT2D* lub *CREBBP*.
- Wyjątkiem jest *GNAI3*, który był zmutowany w 50% przypadkach BLL,11q.
- Tylko geny *DDX3X* and *GNAI3* były powtarzalnie zmutowane w BLL,11q i BL (w ponad 15% przypadków).
- Tylko geny *EZH2, GNAI3* and *TTN* były powtarzalnie zmutowane w BLL,11q i DLBCL,NOS, GCB/FL ($\geq 15\%$).
- Minimalny region duplikacyjny - MDR znajdował się między prążkami 11q23.2-q23.3 zlokalizowany (chr11:114,081,947-118,434,149bp, hg19) a minimalny region utraty - MLR był zlokalizowany na (chr11:127,799,447-133,280,976bp, hg19).
- Ponadto, poza powtarzalną zmianą *11q-gain/loss*, stwierdziliśmy częściową trisomię 12q13.11-q24.32 (w 7/15 przypadków), *gain* (dodatkowy materiał genetyczny) na 7q34-pter i *loss* (utrata materiału genetycznego) w 13q32.3-q34 każdorazowo w 3/15 przypadków. Te zmiany wtórne są inne niż wykazane w naszych wcześniejszych

publikacjach o BLL,11q (6q14-q24 i 18q21-q22) i w BL (powielenie 1q, 7 i 12 oraz utratę 6q, 13q32-34 i 17p).

Reasumując, najważniejszym wynikiem badań było:

- **Wniosek, że genomowy profil BLL,11q różni się od tego ze sporadycznej postaci *MYC*⁺BL na poziomie molekularnym obejmującym poziom chromosomalny i mutacyjny.**
- **Nasze odkrycia molekularne sugerują, że BLL,11q jest odrębnym podtypem chłoniaka od BL i GCB, DLBCL,NOS/FL na poziomie mutacyjnym.**
- **Inaktywacja bi-alleliczna wskazuje na patogenną rolę kompleksu INO80 genu *NFRKB* w BLL,11q.**

Wnioski końcowe:

Zaprezentowane Osiągnięcie Naukowe poszerza wiedzę w zakresie diagnozowanego dotychczas incydentalnie chłoniaka Burkitta bez rearanzacji genu *MYC* (często źle rozpoznawanego na podstawie badań histopatologicznych i źle leczonego z uwagi na decyzje terapeutyczne wynikające z braku rearanzacji *MYC*, co skutkuje nawrotem choroby i niepowodzeniami terapeutycznymi w BLL,11q). Przez wiele lat istniały wątpliwości czy istnieje *MYC-negative* BL. Zgodnie z klasyfikacją WHO 2008 nowotworów układu chłonnego od 5 do 10% przypadków BL nie wykazuje translokacji *MYC*. Do momentu opublikowania aktualizacji klasyfikacji WHO 2017 nie istniały histopatologiczne kryteria diagnostyczne, pozwalające na postawienie jednoznacznego rozpoznania *MYC-negative* BL, w przypadku braku rearanzacji *MYC*. Publikacje prezentowane w Osiągnięciu Naukowym są faktycznym zwieńczeniem wieloletnich poszukiwań mechanizmu molekularnego odpowiedzialnego za rozwój *MYC-negative* BL i są dotychczas pierwszymi i jedynymi w skali światowej publikacjami dotyczącymi nowego podtypu chłoniaka, którego odkrycie w 2011r przez zespół pracowników Centrum Onkologii w Warszawie zostało uwzględnione w nowej aktualizacji klasyfikacji WHO 2017. Zgodnie z tym uaktualnieniem i opisanymi przez nas kryteriami diagnostycznymi przypadki chłoniaków wykazujące podobieństwa kliniczno-patomorfologiczne do BL bez translokacji *MYC*, ale posiadające aberrację w obrębie długiego ramienia chromosomu 11, są włączane do nowej tymczasowej jednostki nozologicznej – chłoniaka podobnego do chłoniaka Burkitta z aberracją na długim ramieniu chromosomu 11 (Burkitt-like lymphoma with 11q aberration, BLL,11q).

W prezentowanym cyklu prac przedstawiłem walory poznawcze i nowe walory aplikacyjnego mojego odkrycia BLL,11q. Całość historii odkrycia i charakterystykę kliniczno-patomorfologiczno-molekularną BLL,11q opisuję w kontekście podobieństw i różnic kliniczno-patomorfologiczno-molekularnych dotyczących *MYC-positive* BL.

Wśród walorów poznawczych pracy wykazałem liczne podobieństwa (z pewnymi różnicami) między *MYC-negative* BLL,11q a *MYC-positive* BL w zakresie epidemiologii, obrazu klinicznego choroby, krzywych przeżycia przy stosowaniu intensywnych programów immunochemioterapii dedykowanych leczeniu BL, morfologii, immunofenotypu, profilu ekspresji miRNA oraz genów i ich metylacji oraz wyraźne różnice w zakresie cytogenetycznym i spektrum mutacyjnym genów zaangażowanych w patogenezie omawianych dwóch podtypów BL.

Walog aplikacyjny wynikający z mojego autorskiego, samodzielnie stworzonego algorytmu diagnostycznego opartego o cytometrię przepływową ponad 10000 biopsji cienkoigłowych umożliwia rozpoznanie BLL,11q w 1,5 godziny od wykonania biopsji cienkoigłowej i diagnostykę różnicową, między innymi, z BL, HGBL z rearanżacją *MYC* i *BCL2* i DLBCL. Należy zwrócić uwagę, że opracowany przeze mnie algorytm pozwolił na zdiagnozowanie 19 przypadków BLL,11q, największej liczby przypadków na świecie, zdiagnozowanych i opublikowanych przez autora Osiągnięcia Naukowego. Upraszczając, można stwierdzić, że odkrycie BLL,11q wynikało bezpośrednio z badań FCM z materiału z biopsji cienkoigłowej skorelowanych z badaniami cytogenetycznymi uzyskiwanych z tego samego materiału.

W szczególności :

- Udowodniłem wysoką skuteczność biopsji cienkoigłowej jako metody uzyskiwania materiału diagnostycznego do badań FCM/CC/FISH oraz badań molekularnych w BLL,11q i BL oraz innych agresywnych B-NHLs (walog aplikacyjny).
- Zapropnowałem, korzystając z doświadczenia zdobytego podczas wieloletniej pracy z pacjentami z agresywnymi B-NHLs, praktyczny algorytm postępowania, który łączy rozpoznanie cytologiczno-cytometryczne z obrazem kliniczno - radiologiczno - patologicznym choroby (walog aplikacyjny).
- Przedstawiłem pełen opis kliniczno-patologiczny przypadków BLL,11q i porównałem go z obrazem BL, wykazując pewne różnice (walog poznawczy).
- Zdefiniowałem cech immunofenotypowe (istotnie statystycznie różnice immunofenotypowe) w badaniach FCM/IHC umożliwiające diagnostykę różnicową

BLL,11q i BL (a także HGBL i DLBCL) w rutynowej diagnostyce patomorfologicznej (walor aplikacyjno-poznawczy).

- Zaproponowałem praktyczny algorytmu diagnostyki różnicowej między BLL,11q a BL za pomocą FCM/IHC (walor aplikacyjny).
- Scharakteryzowałem, razem ze współautorami, BLL,11q na poziomie cytogenetyczno-molekularnym, obejmującym, między innymi, ocenę profilu ekspresji genów i sekwencjonowanie nowej generacji z poznaniem szlaków mutacyjnych BLL,11q (walor poznawczy). Z mojego punktu widzenia najprostszym sposobem potwierdzenia rozpoznania BLL,11q jest charakterystyczny obraz kariotypu uzyskiwanego dzięki FNAB (walor aplikacyjny).
- Przedstawiłem nasze obserwacje dotyczące stosowania intensywnej immunochemioterapii programami lekowymi stosowanymi w leczeniu BL, które umożliwiły uzyskiwanie pełnej remisji u 80% chorych, a krzywa przeżycia osiągnęła *plateau*, co jest typowe dla BL (walor aplikacyjno-poznawczy).

5. Wykaz i krótkie omówienie pozostałych osiągnięć naukowo – badawczych:

Łączna liczba publikacji **49** na Web of Science (bez streszczeń zjazdowych), których jestem autorem lub współautorem (**36** publikacji z IF), niewchodzących w skład osiągnięcia naukowego wynosi **31** prac z IF [**10** prac przed doktoratem (5 oryginalne/5 opisów przypadków) i **21** po doktoracie (17 oryginalne/4 opisów przypadków)] oraz **15** publikacji bez IF [2 prace oryginalne i 1 opis przypadku przed doktoratem oraz **6** prac oryginalnych i **4** opisy przypadków po doktoracie], 6 rozdziałów w książkach, w tym jedna w języku angielskim. Całkowity IF z publikacji „niewchodzących” i „wchodzących w skład Osiągnięcia Naukowego” wynosi **147,918** (po doktoracie) + **21.311** (przed doktoratem) = łącznie **169,229** (**1039** punktów MNiSW).

Zwraca uwagę na 7 (4 międzynarodowe i 3 z Centrum Onkologii w Warszawie) publikacji dotyczących chłoniaka z komórek płaszczka (MCL) cyklina D1 (+), opublikowanych w *Blood* (1), *Journal of Clinical Oncology* (1), *British Journal of Hematology* (1), *Journal of Hematopathology* (1), *Cancer Genet Cytogenet* (1), *Modern Oncology* (1), i *J Appl Genet* (1) z cytacją ponad 274 (w latach 2002-2018, scholar.google.pl). Cykl tych prac jest kontynuacją moich zainteresowań MCL-em, chłoniaka, którego diagnostyka była tematem mojego doktoratu. Między innymi, dzięki uzyskaniu 100%

czułości cytometrii przepływowej w diagnostyce MCL, zostałem referencyjnym patologiem dla pacjentów włączanych z Polski w międzynarodowych badaniach sieci *European MCL-network*. W prezentowanych pracach o MCL przedstawiliśmy wyniki prospektywnych prac wielośrodkowych i międzynarodowych, gdyż to gwarantuje zebranie reprezentacyjnej ilości przypadków pozwalających na wyciągnięcie wniosków i wskazanie dalszych kierunków badań w poszukiwaniu nowych biologicznych czynników prognostycznych:

- 1) Rauert-Wunderlich H, Mottok A, Scott DW, Rimsza LM, Ott G, Klapper W, Unterhalt M, Kluin-Nelemans H, Hermine O, Hartmann S, Thorns Ch, **Rymkiewicz G**, Holte H, Dreyling M, Hoster E, Rosenwald A. Validation of the MCL35 gene expression proliferation assay in randomized trials of the European Mantle Cell Lymphoma Network. **British Journal of Haematology** 2018, DOI: 10.1111/bjh.15519.
- 2) Aukema SM, Hoster E, Rosenwald A, Canoni D, Delfau-Larue M-H, **Rymkiewicz G**, Thorns Ch, Hartmann S, Kluin-Nelemans H, Hermine O, Dreyling M, Klapper W. Expression of TP53 is associated with outcome of MCL independent of MIPI and Ki67 in trials of the European-MCL Network. **Blood** 2018;131(4):417-420.
- 3) Hoster E, Rosenwald A, Berger F, Bernd HW, Hartmann S, Loddenkemper C, Barth TF, Brousse N, Pileri S, **Rymkiewicz G**, Kodet R, Stilgenbauer S, Forstpointner R, Thieblemont C, Hallek M, Coiffier B, Vehling-Kaiser U, Bouabdallah R, Kanz L, Pfreundschuh M, Schmidt C, Ribrag V, Hiddemann W, Unterhalt M, Kluin-Nelemans JC, Hermine O, Dreyling MH, Klapper W (2016). Prognostic Value of Ki67 Index, Cytology, and Growth Pattern in Mantle-Cell Lymphoma: Results From Randomized Trials of the European Mantle Cell Lymphoma Network. **J Clin Oncol.** 2016;34(12):1386-94.
- 4) Klapper W, Hoster E, Determann O, Oschlies I, van der Laak J, Berger F, Bernd HW, Cabeçadas J, Campo E, Cogliatti S, Hansmann ML, Kluin PM, Kodet R, Krivolapov YA, Loddenkemper C, Stein H, Möller P, Barth TE, Müller-Hermelink K, Rosenwald A, Ott G, Pileri S, Ralfkiaer E, **Rymkiewicz G**, van Krieken JH, Wacker HH, Unterhalt M, Hiddemann W, Dreyling M; European MCL Network (2009). Ki67 as a prognostic marker in mantle cell lymphoma-consensus guidelines of the pathology panel of the European MCL Network. **J Hematop.** 2009;2(2):103-11.
- 5) Woroniecka R, Grygalewicz B, Pienkowska-Grela B, **Rymkiewicz G**, Konecki R, Swoboda P, Janik P (2007). Variant t(2;11)(p11.2;q13) without *IGK* involvement in a case of mantle cell lymphoma. **Cancer Genet Cytogenet.** 2007;175(2):154-8.
- 6) **Rymkiewicz G**, Gos M, Błachnio K, Woroniecka R, Swoboda P, Pieńkowska-Grela B, Kulińska M, Borawska A, Janik P, Walewski J. MedOncol (2005). Mantle cell lymphomapresenting with paraproteinemia. **Med. Oncol.** 2005;22(3):319-23.
- 7) Woroniecka R, Pieńkowska-Grela B, Grygalewicz B, Rygier J, Witkowska A, **Rymkiewicz G**, Jarońska-Romejko J (2002). Significance of chromosomal markers in the diagnosis of mantle cell lymphoma (MCL). **J Appl Genet.** 2002;43(4):545-53.

100% czułości cytometrii przepływowej w diagnostyce MCL umożliwiła mi również zebranie jednej z największych kohort MCL bez rearanżacji *CCND1* na świecie. Te przypadki zostały włączone do dwóch międzynarodowych badań a wyniki zostały opublikowane w *Blood journal* (2) z cytacją ponad 115 (w latach 2013-2018, scholar.google.pl), w których odkryto molekularne mechanizmy odpowiedzialne za patogenezę MCL cyklina D 1(-).

- 8) Martín-García D, Navarro A, Valdés-Mas R, Clot G, Gutiérrez-Abril J, Prieto M, Ribera-Cortada I, Woroniecka R, **Rymkiewicz G**, Bens S, de Leval L, Rosenwald A, Ferry JA, Hsi ED, Fu K, Delabie J, Weisenburger D, de Jong D, Climent F, O'Connor ShJ, Swerdlow SH, Torrents D, Beltran S, Espinet B, González-Farré B, Veloza L, Costa D, Matutes E, Siebert R, Ott G, Quintanilla-Martinez L, Jaffe ES, López-Otín C, Salaverria I, Puente XS, Campo E, Beà S. Immunoglobulin light chain enhancer hijacking activates *CCND2* and *CCND3* in cyclin D1-negative mantle cell lymphoma **Blood** **2018** doi.org/10.1182/blood-2018-07-862151
- 9) Salaverria I, Royo C, Carvajal-Cuenca A, Clot G, Navarro A, Valera A, Song JY, Woroniecka R, **Rymkiewicz G**, Klapper W, Hartmann EM, Sujobert P, Wlodarska I, Ferry JA, Gaulard P, Ott G, Rosenwald A, Lopez-Guillermo A, Quintanilla-Martinez L, Harris NL, Jaffe ES, Siebert R, Campo E, Beà S (2013). *CCND2* rearrangements are the most frequent genetic events in cyclin D1(-) mantle cell lymphoma. **Blood** **2013**;121(8):1394-402.

Ponadto, chciałbym podkreślić swój udział w 3 międzynarodowych publikacjach dotyczących nowych podtypów molekularnych i czynników predykcyjnych raka sutka z łączną cytacją ponad 644 (2006-2018, scholar.google.pl).

- 10) Sherman ME, Rimm DL, Yang XR, Chatterjee N, Brinton LA, Lissowska J, Peplonska B, Szeszenia-Dabrowska N, Zatonski W, Cartun R, Mandich D, **Rymkiewicz G**, Ligaj M, Lukaszek S, Kordek R, Kalaylioglu Z, Harigopal M, Charrette L, Falk RT, Richesson D, Anderson WF, Hewitt SM, García-Closas M (2007). Variation in breast cancer hormone receptor and HER2 levels by etiologic factors: a population-based analysis. **Int J Cancer** **2007**;121(5):1079-85.
- 11) Yang XR, Sherman ME, Rimm DL, Lissowska J, Brinton LA, Peplonska B, Hewitt SM, Anderson WF, Szeszenia-Dabrowska N, Bardin-Mikolajczak A, Zatonski W, Cartun R, Mandich D, **Rymkiewicz G**, Ligaj M, Lukaszek S, Kordek R, García-Closas M (2007). Differences in risk factors for breast cancer molecular subtypes in a population-based study. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.** **2007**; 16(3): 439-43.
- 12) García-Closas M, Brinton LA, Lissowska J, Chatterjee N, Peplonska B, Anderson WF, Szeszenia-Dabrowska N, Bardin-Mikolajczak A, Zatonski W, Blair A, Kalaylioglu Z, **Rymkiewicz G**, Mazepa-Sikora D, Kordek R, Lukaszek S, Sherman ME (2006). Established breast cancer risk factors by clinically important tumour characteristics. **Br J Cancer** **2006**;95 (1):123-9.

Jest współautorem 54 streszczeń (ustnych lub w formie plakatów zjazdowych) ze zjazdów międzynarodowych i 22 ze zjazdów krajowych, łącznie 76.

6. Dorobek dydaktyczny i popularyzatorski oraz informacja o współpracy międzynarodowej habilitanta

- 1) W latach **2004-2013**, współprowadzenie wraz z Prof. J Walewskim polskiej edycji *Lymphoma forum of Excellence*, LyFE dla lekarzy klinicystów (coroczne spotkania).
Przykładowo (przytoczę pojedynczy przykład z 2011 r): Rymkiewicz G. 1) Prawidłowa diagnostyka DLBCL, 2) Diagnostyka różnicowa chłoniaków śródpiersiowych, 3) Trudności

diagnostyczne chłoniaka Hodgkina, 4) Diagnostyka chorych na chłoniaka grudkowego.

Lymphoma Forum of Excellence. 10 Edycja Polska Sesja wiosenna, Sopot 27-28.05.2011.

- 2) W latach **2014-2018**, współprowadzenie wraz z Prof. M. Prochorec-Sobieszek polskiej edycji *Lymphoma forum of Excellence Pathology*, LyFE dla lekarzy patomorfologów specjalizujących się w hematopatologii (coroczne spotkania).

Przykładowo (przytoczę pojedynczy przykład z 2015 r): Rymkiewicz G. Chłoniaki umiejscowione w układzie pokarmowym i w jamie brzusznej. *Lymphoma forum of Excellence* 2015 Warszawa 20.03.2015.

- 3) W latach **2000–2015** pracowałem na stanowisku asystenta w Zakładzie Cytologii CMKP w Warszawie, moje obowiązki związane były, przede wszystkim, z prowadzeniem bardzo licznych kursów specjalizacyjnych, doskonalących i atestacyjnych dla lekarzy (hematolodzy, immunolodzy kliniczni, onkolodzy, alergolodzy, patolodzy, cytometryści i diagności laboratoryjni) szkolących się w zakresie hemato-onkologicznym (w zakresie nauczania podstaw cytometrii przepływowej w diagnostyce chłoniaków).

Przykładowo przytoczę kursy i wykłady szkoleniowe prowadzone tylko w roku 2008 i 2009:

Nazwa kursu	Nazwisko	Tematy wykładów	Kursy za 2008
1) Rejestracja nowotworów złośliwych. Wprowadzenie do kodowania nowotworów w klasyfikacji ICD-O”. Międzynarodowa Klasyfikacja Chorób dla Onkologii, trzecia edycja Warszawa , 13-15.10.2008.	Rymkiewicz G	- Schorzenia hematologiczne, - Wprowadzenie do kodowania nowotworów układu chłonnego w klasyfikacji ICD-O”, - Międzynarodowa Klasyfikacja Chorób dla Onkologii trzecia edycja.	2 wykłady
2) <i>Lymphoma Forum of Excellence</i> , Lyfe Polska Edycja Ryn k. Olsztyna 10-11.04.2008.	Rymkiewicz G	- Trudności w diagnostyce chłoniaków agresywnych, - DLBCL - problemy diagnostyczne, - ALCL - na co musi uważać patolog.	wykłady
3) Instytut Reumatologii Warszawa , 03.10.2008	Prochorec-Sobieszek M, Rymkiewicz G, et al.	- Charakterystyka proliferacji z dużych ziarnistych limfocytów T u chorych z neutropenią i zapaleniem stawów.	wykład

4) Diagnostyka immunofenotypowa Kurs CMKP Warszawa , 02.04.2008/16.10.2008.	Rymkiewicz G	- Immunofenotypowa diagnostyka ostrych białaczek i chłoniaków, - Klasyfikacja WHO chłoniaków, - Badanie subpopulacji limfocytów.	2 kursy
5) Podstawy immunologii klinicznej i alergologii, KURS SPECJALIZACYJNY CMKP Warszawa , 21-25.04.2008.	Rymkiewicz G	- Dojrzewanie i krążenie limfocytów.	1 kurs
6) Fenotypowanie białaczek i chłoniaków. KURS ATESTACYJNY DLA HEMATOLOGÓW CMKP Warszawa , 08-10.04.2008.	Rymkiewicz G	- Klasyfikacja WHO chłoniaków, - Ocena cytometryczna fenotypu chłoniaków z małych i dużych limfocytów B, - Biopsja cienkoigłowa węzła chłonnego i znakowanie komórek uzyskanej zawiesiny przeciwciałami monoklonalnymi, wprowadzanie kk. do cytometru, - Nowotwory z prekursorowych limfocytów T i B.	1 kurs
7) Immunologia nowotworów KURS CMKP Warszawa , 10-14.03.2008.	Rymkiewicz G	- Diagnostyka nowotworów hematopoetycznych.	1 kurs
8) Cytometria przepływowa w diagnostyce schorzeń immunologicznych i limfoproliferacyjnych. KURS SPECJALIZACYJNY CMKP Warszawa , 13-15.02.2008/ 13-15.05.2008/01-03.10.2008.	Rymkiewicz G	- Klasyfikacja schorzeń limfoproliferacyjnych, - Immunofenotyp w chorobach limfoproliferacyjnych, - Analiza fenotypu komórek szpiku, węzłów, krwi obwodowej, - Analiza biopsji cienkoigłowej dla celów diagnostycznych, - Samodzielna praca przy cytometrze. Analiza wybranych przypadków.	3 kursy
9) Podstawy immunologii dla lekarzy. KURS CMKP Warszawa , 14-17.04.2008.	Rymkiewicz G	- Dojrzewanie limfocytów populacje, subpopulacje.	1 kurs
10) Nowotwory Układu Chłonnego. Kurs SPECJALIZACYJNY organizowany przez Polskie Towarzystwo Onkologii Klinicznej Warszawa , 2008.	Rymkiewicz G	- Rola cytometrii przepływowej w nowoczesnej diagnostyce chłoniaków.	2 kursy

11) Rejestracja nowotworów złośliwych” Warszawa, 7-9.09.2009.	Rymkiewicz G	- Grupy histologiczne nowotworów złośliwych.	wykład
12) Rejestracja nowotworów złośliwych. Wprowadzenie do kodowania nowotworów w klasyfikacji ICD-O -3” Międzynarodowa Klasyfikacja Chorób dla Onkologii trzecia edycja Warszawa, 18.09.2009.	Rymkiewicz G	- Zasady kodowania chłoniaków Hodgkina i niehodgkinowskich, chłoniaków z komórek B, T i NK, chłoniaków limfoblastycznych z komórek prekursorowych, guzów plazmatycznokomórkowych, guzów z komórek tłuszczowych, chorób immunoproliferacyjnych, białaczek (kody morfologiczne M959-M998).	2 wykłady
13) <i>Lymphoma Forum of Excellence</i> Lyfe, 6 Edycja Polska Sesja wiosenna Kazimierz Dolny, 08-09.05.2009.	Rymkiewicz G	- DLBCL – problemy diagnostyczne, - ALCL, T-NHL – rola patologa, - Chłoniak Burkitta – na co zwracać uwagę.	wykłady
14) Fenotypowanie białaczek i chłoniaków. KURS ATESTACYJNY DLA HEMATOLOGÓW CMKP Warszawa, 06-08.04.2009.	Rymkiewicz G	- Klasyfikacja WHO chłoniaków, - Ocena cytometryczna fenotypu chłoniaków z małych i dużych limfocytów B, - Biopsja cienkoigłowa węzła chłonnego i znakowanie komórek uzyskanej zawiesiny przeciwciałami monoklonalnymi, wprowadzanie kk. do cytometru, - Nowotwory z prekursorowych limfocytów T i B.	1 kurs
15) Cytometria przepływowa w diagnostyce schorzeń immunologicznych i limfoproliferacyjnych. KURS SPECJALIZACYJNY CMKP Warszawa, 16-18.03.2009/ 11-13.05.2009/05-07.10.2009	Rymkiewicz G	- Klasyfikacja schorzeń limfoproliferacyjnych, - Immunofenotyp w chorobach limfoproliferacyjnych. Analiza fenotypu komórek szpiku, węzłów, krwi obwodowej, - Analiza biopsji cienkoigłowej dla celów diagnostycznych, - Samodzielna praca przy cytometrze. Analiza wybranych przypadków.	3 kursy
16) Podstawy immunologii klinicznej i alergologii. Warszawa, 20-24.04.2009	Rymkiewicz G	- Dojrzewanie limfocytów populacje, subpopulacje.	1 kurs
17) Nowotwory Przewodu Pokarmowego. Kurs pod patronatem Unii Europejskiej. Warszawa	Rymkiewicz G	- Chłoniaki Przewodu pokarmowego.	1 wykład

18) Nowotwory Układu Chłonnego. KURS SPECJALIZACYJNY, Szkoła Polskiego Towarzystwa Onkologii klinicznej Nr 5-754-15-201-2009 Warszawa 26-30.01.2009.	Rymkiewicz G	- Standardy w diagnostyce chłoniaków, - Badania rutynowe (histopatologiczne i immuno-histochemiczne) oraz znaczenie cytometrii przepływownej.	1 kurs
---	--------------	--	--------

4) W latach 1997-2016 prowadziłem cotygodniowe kominki patologiczne na lekarzy Kliniki Nowotworów Układu Chłonnego Centrum Onkologii Instytut im. M. Curie-Skłodowskiej w zakresie kształcenia lekarzy klinicystów korelowania obrazu kliniczno-patologiczno-cytogenetycznego chorych leczonych w Klinice, wspólnie ustalając indywidualne i optymalne postępowanie terapeutyczne.

5) Współpraca międzynarodowa:

- a) A randomized phase III study in previously untreated patients with biological high-risk CLL: Fludarabine + cyclophosphamide (FC) versus FC + low-dose alemtuzumab (HOVON 68) (wykonawca).
- b) *The European LeukemiaNet*" (wykonawca), której końcowym efektem była publikacja rozdziału o chłoniaku Burkitta w podręczniku w języku angielskim.
- c) EORTC Lymphoma Group (*LYMG*).
- d) *The European Myeloma Network* (wykonawca), której końcowym efektem była publikacja w *Haematologica* (1), dotycząca standardów diagnostyki cytometrycznej szpiczaków.
- e) ACT-1, ACT-2 (Peripheral T-cell lymphomas trials) (wykonawca), której efektem był plakat i prezentacja ustna na ostatnim ASH 2018 pod tytułem „Final Analysis of the Front-Line Phase III Randomized ACT-1 Trial in Younger Patients with Systemic Peripheral T-Cell Lymphoma Treated with CHOP Chemotherapy with or without Alemtuzumab and Consolidated By Autologous Hematopoietic Stem Cell Transplantation”.
- f) *The European MCL Network* (2004), ścisła współpraca z prof. Wolframem Klapperem, której efektem są 4 publikacje dotyczące chłoniaka z komórek płaszczka, opublikowane w *Blood* (1), *Journal of Clinical Oncology* (1), *British Journal of Hematology* (1), *Journal of Hematopathology* (1). Nadal czynnie współpracuje z wieloma europejskimi ośrodkami patomorfologicznymi w zakresie diagnostyki MCL (dwa nowe randomizowane badania kliniczne *European MCL-Network*, w których jestem referencyjnym patologiem) oraz przygotowujemy nową publikację.
- g) Współpraca z prof: Itziar Salaverria, Syla Bea i Elias Campo, Department of Pathology, Hematopathology Unit, Hospital Clínic, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i

Sunyer, University of Barcelona, Barcelona, Spain, której efektem są 2 publikacje dotyczące chłoniaka z komórek płaszczka bez rearanżacji *CCND1* i jedna publikacja dotycząca chłoniaka podobnego do chłoniaka Burkitta z aberracją 11q, wszystkie opublikowane w *Blood* (3) (ostatnia publikacja zawarta w moim Osiągnięciu Naukowym jako praca numer 2) oraz jedna publikacja dotycząca chłoniaków *Double Hit Lymphoma* opublikowana w *Oncogene* (1) wynikająca ze współpracy z Gaël Roué, Molecular Genetics Unit, Department of Hematology, Vall d'Hebron University Hospital, Barcelona, Spain.

- h) Współpraca (z prof. Reiner Siebert) Institute of Human Genetics, University Hospital Schleswig-Holstein Campus Kiel/Christian-Albrechts University, Kiel, Germany i Institute of Human Genetics, Ulm University and Ulm University Medical Center, Ulm, Germany – dzięki tej współpracy opublikowano 2 prace dotyczące chłoniaka podobnego do chłoniaka Burkitta z aberracją 11q (zawarte w moim Osiągnięciu Naukowym jako praca numer 2 i 6) w *Blood* (2).
- i) Współpraca (z prof. Dave Sandeep) z Department of Medicine, Division of Hematologic Malignancies & Cellular Therapy, Duke University, Durham, NC, USA – dzięki tej współpracy publikacja w trakcie recenzji, dotycząca sekwencjonowania nowej generacji w chłoniaku Burkitta.

