

Recenzja Rozprawy Doktorskiej

Lek.med Bartosza Chyżyńskiego

Rola polimorfizmu genu receptora TLR4 w występowaniu zakażeń bakteryjnych u pacjentów z ostrą białaczką limfoblastyczną w trakcie intensywnej chemioterapii

W przedstawionej do recenzji pracy Doktorant podjął się analizy wpływu polimorfizmu receptora TLR4 na występowanie zakażeń bakteryjnych u dzieci w trakcie leczenia ostrej białaczki limfoblastycznej.

Receptor TLR4 należy do rodziny receptorów Toll-podobnych. Pierwszą opisaną funkcją tego receptora było rozpoznawanie cząsteczek egzogennych patogenów w szczególności lipopolisacharydów bakterii gram ujemnych. Receptor ten bierze również udział w rozpoznawaniu endogennych cząsteczek uwalnianych z uszkodzonych tkanek lub komórek martwiczych. Jego ekspresję wykazano na komórkach układu immunologicznego, a także na komórkach śródbłonna i nabłonka. Receptor TLR4 odgrywa kluczową rolę w procesach zapalnych spowodowanych czynnikami infekcyjnymi i nieinfekcyjnymi. Pobudzenie tego receptora powoduje aktywację szeregu czynników i szlaków prowadząc do ekspresji licznych genów włączonych w odpowiedź immunologiczną. Dane doświadczalne wskazują, że w przypadku, gdy szlaki aktywacji TLR4 są nieprawidłowo regulowane dojść może do zaburzeń w odpowiedzi immunologicznej i niekontrolowanego przebiegu infekcji. Przyczyną nieprawidłowego funkcjonowania receptora TLR4 są mutacje w genach kodujących ten receptor. Badania wskazują, że polimorfizm pojedynczego nukleotydu wydaje się mieć największy wpływ na funkcjonowanie receptora TLR4. Sugeruje się również, że u pacjentów z mutacją w genach kodujących receptor TLR4 występuje zwiększona zachorowalność na zakażenia bakteryjne o ciężkim przebiegu i wysokim ryzyku sepsy. Z uwagi na rozbieżne wyniki badań in vitro i in vivo nie ma ostatecznych dowodów świadczących o roli receptora TLR4 w zakażeniach. Dodatkowo nie ma żadnej publikacji dotyczącej dzieci z zakażeniami występującymi w następstwie leczenia onkologicznego.

Ryzyko zakażenia bakteryjnego, wirusowego, grzybiczego w przebiegu leczenia przeciwnowotworowego wielolekową chemioterapią jest bardzo wysokie.

Dotyczy to w szczególności dzieci leczonych z powodu ostrej białaczki limfoblastycznej, u których ryzyko zgonu z powodu infekcji wynosi ponad 2 %.

Doktorant wybrał tą grupę chorych do zbadania roli mutacji genu receptora TRL4 w zakażeniach bakteryjnych.

Wybór tematyki pracy uważam za bardzo ciekawy i ważny, tak w aspekcie poznawczym, jak i aplikacyjnym. Potwierdzenie, że istnieje zależność między mutacją genu receptora TRL4 a występowaniem ciężkich powikłań infekcyjnych pozwoliłoby na identyfikację pacjentów z grupy wysokiego ryzyka, a także byłoby przyczynkiem do poszukiwania celów terapeutycznych dla tych chorych.

Praca ma typowy układ edytorski, liczy 94 strony, składa się z 13 rozdziałów i 31 podrozdziałów i jest ilustrowana 13 rycinami oraz 22 tabelami umieszczonymi i omówionymi w tekście. Ryciny i tabele zostały przygotowane bardzo starannie, zawierają wszystkie istotne dane, co pozwala czytelnikowi z łatwością zrozumieć wyniki przeprowadzonych badań.

Uwagi: Ryc. 3 - obraz żelu po przeprowadzonym rozdziale elektroforetycznym uzyskanych produktów jest dla mnie nieczytelny, zastosowany marker wielkości wydaje się nieadekwatny do badanych produktów reakcji PCR.

Proponuję również, aby w przyszłej publikacji nazwy genów zapisać kursywą i dokonać zapisu zmian molekularnych wg nomenklatury HGVS (Human Genome Variation Society).

Piśmiennictwo, obejmujące 156 pozycji, zawierające najważniejsze i najnowsze publikacje (66 pozycji z lat 2014-2020) związane z omawianym tematem, jest właściwie dobrane i cytowane. Autor powołuje się również na autorów polskich. Treść pracy odpowiada jej tytułowi, podobnie jak treść rozdziałów z ich nagłówkami. Poszczególne części rozprawy mają właściwe proporcje.

We wstępie Doktorant omawia szczegółowo wiadomości dotyczące zachorowalności i patogenezy ostrej białaczki limfoblastycznej u dzieci. W oparciu o dane z wielu źródeł Autor wskazuje na postęp jaki dokonał się w ostatnich 70 latach na świecie w leczeniu ALL u dzieci, wyniki leczenia obecnie sięgają 90% długoletnich przeżyć. Omawia historycznie udział wybitnych uczonych lekarzy w rozwoju dziedziny tak z zagranicy jak i z Polski. Szczególnie bliski mi jest opis roli polskich lekarzy, uczonych, naszych nauczycieli w organizacji opieki nad dziećmi z białaczkami, dzięki którym postęp w leczeniu był udziałem również naszych pacjentów. Obecnie wyniki leczenia polskich dzieci z ALL nie odbiegają od wyników

z innych renomowanych ośrodków światowych. Tą wiedzę powinni posiadać wszyscy pediatrzy onkologów i hematologów dziecięcy.

Następnie Doktorant omawia kierunki dalszego postępu w leczeniu ALL u dzieci z uwzględnieniem leczenia celowanego. Zwraca uwagę, że mimo postępu w leczeniu ALL u dzieci nie udaje się uniknąć powikłań infekcyjnych, które zagrażają życiu bądź są przyczyną zgonu. W kolejnych rozdziałach Autor przedstawia rodzaje infekcji, mechanizmy immunologiczne biorące udział w ich zwalczaniu. Bardzo szczegółowo omawia receptory Toll-podobne, które są przedmiotem tej dysertacji. Wskazuje, w oparciu o dostępne doniesienia, że biorą one udział w kontroli infekcji chociaż do końca ich rola u ludzi nie jest udokumentowana. Z tego powodu Doktorant obrał sobie za cel zbadanie roli mutacji genu receptora TLR4 w zakażeniach bakteryjnych u dzieci z ALL.

Wstęp pracy jest syntetyczny i zawiera obszernie informacje, stanowiące podstawy zrozumienia celu przeprowadzonych badań. Napisany jest bardzo przejrzysto, świadcząc o doskonałej wiedzy Doktoranta.

Nie mam żadnych komentarzy do wstępu

Cel pracy został jasno sformułowany. Za cel pracy Doktorant obrał określenie roli mutacji genu receptora TLR4 w zakażeniach bakteryjnych u dzieci z ALL. Skoncentrował się na polimorfizmach pojedynczego nukleotydu (SNP) genu receptora TLR4 (Asp299Gly oraz Thr399Ile) dociekając, czy któryś z nich sprzyja występowaniu infekcji bakteryjnych i który z nich ma większy wpływ na częstość występowania zakażeń u dzieci leczonych z powodu ALL.

W rozdziale „Materiał, metody” lek med. Bartosz Chyżyński scharakteryzował 111 pacjentów pod względem płci, wieku w momencie rozpoznania, podtypu ALL, grup ryzyka, okresu obserwacji. U każdego pacjenta pobrano krew na obecność badanych SNP. Retrospektywnie ocenił występowanie infekcji bakteryjnych u każdego pacjenta. Doktorant szczegółowo opisał metodologię przeprowadzonych badań.

Uzyskane wyniki zostały skorelowane z wymienionymi w metodyce czynnikami klinicznymi z zastosowaniem analizy statystycznej.

Uwagi: Proponuję, aby w przyszłej publikacji uwzględnić ocenę rozkładu alleli wg Prawa Hardy’ego-Weinberga

W rozdziale „Wyniki” Autor przeprowadza bardzo wnikliwą analizę uzyskanych wyników i przedstawia je w postaci opisowej oraz w odpowiednich

rycinach i tabelach stwierdzając, że wystąpienie mutacji genu receptora TLR4 zarówno SNP Asp299Gly jak i SNP Thr399Ile nie wiąże się ze zwiększonym ryzykiem zakażeń bakteryjnych u dzieci leczonych z powodu ostrej białaczki limfoblastycznej oraz że ani płeć ani przynależność do odpowiednich grup ryzyka nie mają wpływu na częstość występowania zakażeń bakteryjnych niezależnie od badanej przez Autora mutacji genu receptora TLR4.

Uzyskane wyniki badań i obliczeń Autor przedstawił w sposób przejrzysty, co jest dowodem znajomości warsztatu badawczego. Znajomość metod stosowanych w badaniach molekularnych, analiza i interpretacja wyników są żmudnym, wymagającym właściwej wiedzy procesem. Autor poradził sobie doskonale z tym problemem.

Bardzo wartościową częścią pracy jest dyskusja, w której Doktorant omawia wyniki i umiejętnie odnosi się do danych pochodzących z publikacji światowych.

Na szczególną uwagę zasługuje fakt, że Autor krytycznie podchodzi do własnych wyników. Dostrzega ewentualne przyczyny różnic w wynikach badań, które mogą wynikać z wielkości analizowanej grupy, co w mojej opinii jest najbardziej prawdopodobne, jak również z czynników osobniczych opisywanych w literaturze pacjentów. Mimo stwierdzenia braku korelacji mutacji w genie dla receptora TLR4 z występowaniem zakażeń u dzieci w trakcie leczenia ALL Autor uważa, że nie można całkowicie wykluczyć roli predyspozycji genetycznej w częstości zakażeń i że należy prowadzić dalsze badania w tym kierunku. Uważam, że jest to trafne stwierdzenie.

Dyskusja nie była łatwa do przeprowadzenia biorąc pod uwagę, że Doktorant musiał odnosić się do badań głównie u dorosłych, w przebiegu różnych schorzeń i sytuacji klinicznych. Mimo tych obiektywnych trudności Autor bardzo umiejętnie sobie z tym poradził, co znów świadczy o znakomitej znajomości zagadnienia. Powołując się na badania na modelach mysich Doktorant przedyskutował wyniki własne i innych autorów pod kątem roli antybiotyków, wpływających na zmianę flory jelitowej i spadek ekspresji receptora TLR4 na komórkach ściany jelit prowadząc do zaburzeń rozpoznawania drobnoustrojów i infekcji. Poszerzenie dyskusji o wyniki badań na modelach zwierzęcych umacnia moją opinię o dojrzałości naukowej Doktoranta.

Wartościową częścią pracy są dwa wnioski, w których Autor zwięźle odnosi się do uzyskanych wyników.

Uważam, że przedstawiona do recenzji praca jest nowatorska w Polsce i na świecie. Jest wartościowym wkładem do danych światowych na temat roli polimorfizmu genu receptora TLR4 w występowaniu zakażeń bakteryjnych u dzieci z ostrą białaczką limfoblastyczną w trakcie intensywnej chemioterapii. Mimo braku wykazania korelacji między mutacją genu receptora TLR4 a występowaniem zakażeń bakteryjnych w trakcie leczenia ALL u dzieci z jednego ośrodka wyniki przeprowadzonej przez Doktoranta analizy mogą stanowić bazę dla przyszłych badań w nowotworach u dzieci i młodzieży w Polsce.

Pracę oceniam wysoko.

Uwagi do przedstawionej pracy zamieściłam w tekście recenzji. Nie wpływają one jednak na wartość merytoryczną dysertacji.

Podsumowanie.

Uważam, że Autor wykazał umiejętność samodzielnej pracy naukowej.

Przedstawiona do recenzji praca spełnia wymogi przewidziane w art. 13 ust. 1 ustawy z dn. 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym.

Wobec powyższego, mam zaszczyt przedstawić wniosek do Wysokiej Rady Naukowej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie lek. med. Bartosza Chyżyńskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie wnioskuję o wyróżnienie pracy.

Uzasadnienie.

Praca ma charakter nowatorski w Polsce i na świecie. Jest jedną z nielicznych podobnych analiz w dostępnym piśmiennictwie. Wnosi konkretną wiedzę, która przyczyni się do dalszego rozwoju dyscypliny naukowej. W mojej ocenie w pełni zasługuje na wyróżnienie.

Dr hab. n med. Bożenna Dembowska-Bagińska, prof. IPCZD

Kierownik Kliniki Onkologii Instytutu „Pomnik Centrum Zdrowia Dziecka”



23.07.2020