



UNIwersytet Medyczny IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH WE WROCLAWIU

Prof. dr hab. n. med. Krzysztof Kałwak
Katedra i Klinika Transplantacji Szpiku,
Onkologii i Hematologii Dziecięcej
Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu
ul. Borowska 213, 50-368 Wrocław

Wrocław 31.05.2020

OCENA ROZPRAWY na STOPIEŃ DOKTORA NAUK MEDYCZNYCH I NAUK O ZDROWIU W DYSCYPLINIE NAUKI MEDYCZNE

Lek. Magdaleny Wołowicz

pt.: *Charakterystyka kliniczna dzieci z limfohistiocytozą hemofagocytarną.*

W dobie pandemii COVID-19 temat limfohistiocytozy hemofagocytarnej (HLH) nabiera nowego znaczenia. Doniesienia z USA przedstawiają dzieci, u których po przechorowaniu infekcji SARS-CoV-2 dochodzi do powstania wtórnych, zagrażających życiu chorób autozapalnych o przebiegu zbliżonym do choroby Kawasaki lub właśnie HLH.

Wyróżniamy postać pierwotną (uwarunkowaną genetycznie) oraz wtórną (nabytą) postać HLH. Postacie wtórne rozwijają się w następstwie intensywnej aktywacji układu immunologicznego w przebiegu zakażeń, chorób nowotworowych, autoimmunizacyjnych lub innych i teoretycznie charakteryzują się łagodniejszym przebiegiem i zwykle nie wymagają przeszczepienia allogenicznych komórek hematopoetycznych.

Zapadalność na pierwotne HLH u dzieci jest niska i wynosi ok. 1,2-1,5 na milion na rok. Opublikowane dane z różnych krajów wskazują na różnice w zakresie typu mutacji i częstości występowania HLH w różnych populacjach i grupach etnicznych. Brak jest w piśmiennictwie danych na temat podłoża genetycznego rozwoju HLH w Polsce.

Celem pracy doktorskiej lek. Magdaleny Wołowicz było ustalenie podłoża rozwoju HLH u dzieci w Polsce, analiza przebiegu klinicznego choroby z uwzględnieniem odpowiedzi na leczenie, częstości występowania nawrotów choroby oraz prawdopodobieństwa przeżycia w całej badanej grupie i w poszczególnych postaciach HLH. W tym kontekście badania Doktorantki są bardzo interesujące i wręcz nowatorskie z punktu widzenia poznawczego, jak i klinicznego, tym bardziej, że na chwilę obecną nie istniała w Polsce tak szeroka i wnikliwa analiza przypadków HLH. I choć liczba pacjentów (63) nie wydaje się imponująca, trzeba pamiętać, że są to chorzy zebrani z wszystkich ośrodków onkologii i hematologii dziecięcej w kraju w latach 2008 -2018. Dla Recenzenta to zatem wielki zaszczyt, by móc oceniać pracę dotyczącą tak istotnego naukowo i klinicznie tematu. Jest to bez wątpienia pierwsza praca w Polsce podsumowująca epidemiologię, trudną diagnostykę i leczenie tych rzadkich, acz śmiertelnie niebezpiecznych zespołów chorobowych. Warto podkreślić, że Doktorantka zajęła się również HLH z zajęciem centralnego systemu nerwowego.

Przedłożona mi do oceny praca pt: „*Charakterystyka kliniczna dzieci z limfohistiocytozą hemofagocytarną*” liczy 115 stron i posiada typowy dla tego typu rozpraw układ. Składa się ze spisu treści oraz rozdziałów zatytułowanych: *Wykaz tabel, Wykaz rycin, Wykaz skrótów, Streszczenie w języku polskim i angielskim,*

Wstęp, Cele pracy, Materiały i Metody, Wyniki, Dyskusja oraz Wnioski. W dalszej kolejności znajdują się: spis piśmiennictwa, opinia Komisji Bioetycznej oraz jednostronicowy aneks, przedstawiający arkusz z bazy danych. Ten arkusz z bazy danych podkreśla szeroki zakres analizowanych przez Doktorantkę czynników i jest unikalnym i niezwykle potrzebnym elementem klinicznej rozprawy doktorskiej.

Spis treści jest bardzo przejrzysty i ułatwia czytanie pracy.

Całość *Wstępu* przedstawiona jest w sposób czytelny, w oparciu o najnowsze światowe publikacje. Jest on napisany zrozumiałym językiem i szczegółowo przedstawia zarówno klasyfikację jak i immunopatogenezę i leczenie HLH. Rozdział ten mógłby stanowić sam obszerną pracę pogładową lub rozdział w podręczniku onkohematologii dziecięcej. Brakuje mi we *Wstępie* lub w *Dyskusji* komentarza na temat rodzeństwa chorego na HLH, a będącego nosicielem defektu genetycznego. Warto podkreślić, że nosiciel w razie zgodności w układzie HLA może być dawcą szpiku dla chorego rodzeństwa. HLH to choroba immunologiczna związana z nadmierną odpowiedzią układu odpornościowego, a nie metaboliczna.

Dane zgromadzone w Klinice Pediatrii, Hematologii i Onkologii w Warszawie jako ośrodkiem koordynującym leczenie HLH w Polsce były inspiracją do przeprowadzenia retrospektywnej analizy klinicznej i sformułowania 3 ambitnie postawionych i złożonych celów.

Doktorantka z niezwykłą starannością przedstawiła metodologię badań w rozdziale *Materiały i Metody*. Godny uwagi jest fakt wykonywania znacznej części badań immunologicznych w Zakładzie Diagnostyki Laboratoryjnej i Immunologii Klinicznej Wieku Dziecięcego WUM. Dobór metod nie budzi zastrzeżeń, jest on adekwatny do postawionych konkretnych celów, a ich opis świadczy o bardzo dobrym opanowaniu praktycznym przez Doktorantkę. Uwagę zwraca znakomita dydaktycznie rycina 4, która przedstawia wyniki cytometrycznego testu cytotoksycznego z udziałem linii komórkowej K562. Zastosowane przez Doktorantkę metody analizy statystycznej nie budzą najmniejszych zastrzeżeń.

Wyniki badań zostały przedstawione opisowo oraz w formie przejrzystych tabel i rycin, w tym bardzo nowatorskiej zbiorczej tabeli VI z analizą molekularną pacjentów z pierwotną postacią HLH.

Badaną grupę stanowiło 63 pacjentów zdiagnozowanych na przestrzeni 10 lat obserwacji. Czy zatem średnio w roku w Polsce mamy 6 nowych rozpoznań? Nie ma na to jednoznacznej odpowiedzi, bo pewna część pacjentów jest przeszczepiana zanim rozwinie objawy HLH. Przeszczepienie jest tu wykonywane preemptywnie z powodu rozpoznania odpowiedniego defektu genetycznego (np. XLP1, XLP2).

Z obowiązku recenzenta muszę przyznać, że można zrezygnować z ryciny 14, przedstawiającej prawdopodobieństwo całkowitego przeżycia pacjentów z poszczególnymi postaciami HLH poddanymi SCT (np. tylko 4 pacjentów z XLP). Grupa jest heterogenna i podgrupy pacjentów są zbyt mało liczebne do celów analizy statystycznej, a tym bardziej do przedstawiania wyników w postaci ryciny. W Tabeli VIII z kolei, czytelnik byłby nieco bardziej usatysfakcjonowany, gdyby zamiast odchylenia standardowego mógł odczytać zakres *Min-Max* dla poszczególnych zmiennych. Unikalna w skali polskiej jest Tabela XI przedstawiająca charakterystykę pacjentów z zajęciem centralnego systemu nerwowego OUN-HLH.

W *Dyskusji* Doktorantka analizuje wyniki swoich badań konfrontując własne spostrzeżenia z wnioskami innych badaczy zajmujących się podobnymi zagadnieniami. Należy podkreślić umiejętność korzystania przez nią z piśmiennictwa naukowego oraz jej wiedzę teoretyczną dotyczącą badanych zagadnień. Doktorantka stara się nie tylko zinterpretować obserwacje własne, ale też wyjaśnić przyczyny zaobserwowanych zjawisk. Poczynione przez nią obserwacje i szczegółowe analizy statystyczne mają znaczenie nie tylko poznawcze, ale również kliniczno-praktyczne. Po przeczytaniu pracy czytelnik nie będzie miał wątpliwości, że pacjentów z pierwotnymi postaciami HLH należy jak najszybciej poddać allogenicznemu przeszczepieniu po uzyskaniu remisji immunohematologicznej, a także, że postacie z zajęciem OUN rokują gorzej. Z własnej obserwacji klinicznej pamiętam dwie siostry z Zespołem Griscellego, u których tylko u jednej udało się doprowadzić do skutecznej transplantacji komórek hematopoetycznych, wykonanej w 2006 roku, druga zmarła z powodu progresji HLH z zajęciem OUN. Autorka zwraca uwagę w *Dyskusji* na przyrost rozpoznań HLH w drugiej połowie analizowanego okresu, co zapewne wynika z doskonalszej diagnostyki i większej świadomości zespołów lekarskich dotyczących rozpoznania i leczenia HLH. Autorka wykazuje się także, godnym pochwały, samokrytycyzmem. Słusznie wnioskuje, że fakt, iż wynik badania aktywności komórek NK był dostępny jedynie u 45 spośród 63 pacjentów oraz brak

badania kontrolnego i oceny aktywności komórek NK po zastosowaniu leczenia, należy traktować jako ograniczenia pracy. Brak jest również danych o liczbie płytek krwi u pacjentów z MAS.

Dyskusja dotycząca aspektów terapii HLH jest obszerna i wartościowa. Jako recenzent muszę stwierdzić, że brakuje mi w pracy informacji o nowatorskiej terapii emapalumabem (przeciwciałem anti-IFN-gamma), który to lek jako bardzo skuteczny uzyskał rejestrację FDA (USA) pod koniec 2018 r. Wyniki badania fazy II/III z zastosowaniem emapalumabu u dzieci z HLH zostały niedawno opublikowane w *New England Journal of Medicine* i potwierdzają wysoką efektywność kliniczną i niewielką toksyczność u dzieci z pierwotną postacią HLH, a także u dzieci już leczonych wcześniej z powodu HLH.

Jedną z niezwykle interesujących obserwacji Doktorantki był wysoki odsetek nawrotów, które wystąpiły u 25,8% pacjentów z I-HLH (HLH związanych z infekcją). Nawroty HLH występują częściej w pierwotnych postaciach HLH, zatem nawrót HLH u pacjentów z brakiem potwierdzonego molekularnie podłoża HLH i brakiem leżącej u podłoża choroby rozrostowej lub autoimmunizacyjnej może przemawiać za prawdopodobną pierwotną postacią choroby i to stwierdzenie nadaje się na jeden z wniosków wynikających z pracy. Doktorantka prowadzi w *Dyskusji* słuszne rozważania nad klasyfikacją HLH. Niezwykle cenna jest uwaga, że dotychczasowy klarowny podział na pierwotną i wtórną postać HLH wydaje się mieć coraz mniejsze znaczenie kliniczne, a oczekiwanie na wynik badania molekularnego nie powinno opóźniać rozpoczęcia leczenia. Bardzo istotne jest również spostrzeżenie Doktorantki, dotyczące konieczności skrócenia oczekiwania na transplantację komórek hematopoetycznych u dzieci z pierwotną postacią HLH. Odsetek chimeryzmu dawcy po transplantacji komórek hematopoetycznych jest kluczowy dla sukcesu przeszczepienia dzieci z HLH: uważa się, że min 20-30% stabilnego chimeryzmu dawcy zapobiega wznowie. W badanej przez Doktorantkę grupie nie wystąpił nawrót po przeszczepieniu, jednak u jednego pacjenta doszło do odrzucenia przeszczepu. Brak jest w pracy informacji o dalszych losach dziecka po odrzuceniu przeszczepu: co mogło być powodem odrzucenia przeszczepu i czy wykonano drugie przeszczepienie.

W *Dyskusji* można znaleźć niezwykle ważny wniosek Doktorantki, nie ujęty niestety na liście *Wniosków*, mianowicie, cyt. „Przedstawione wyniki wskazują

również, iż dotychczasowy klarowny podział na pierwotną i wtórną postać HLH wydaje się mieć coraz mniejsze znaczenie kliniczne, gdyż dopiero obserwacja przebiegu klinicznego, w tym ocena odpowiedzi na leczenie i występowanie nawrotów choroby wskazuje na prawdopodobnie pierwotną postać choroby i stanowi wskazanie do transplantacji komórek macierzystych jako szansy trwałego wyleczenia pacjenta". W pełni zgadzam się z obserwacją Doktorantki, że rozpoznanie XLP2 nie oznacza od razu zwiększonego ryzyka śmiertelności okołoprzeszczepowej. Doświadczenia z Polski przeczą negatywnym doniesieniom Marsh i wsp. Na końcu *Dyskusji* Doktorantka nawiązuje do roli infekcji COVID-19 jako nowego czynnika wyzwalającego HLH i jest to, moim zdaniem, niezwykle inteligentne i wartościowe zakończenie *Dyskusji*.

Wnioski sformułowane są w dziesięciu punktach i stanowią odpowiedź na zadane w celu pracy trzy pytania. Z obowiązku recenzenta muszę zauważyć, że niektóre wnioski (np. nr 4 czy 5) są bardziej wynikami pracy niż wnioskami, ale z drugiej strony rozumiem, że charakter rozprawy wymagał przedstawienia najważniejszych wyników pracy w tym podrozdziale.

Podsumowując stwierdzam, że przedłożona mi do recenzji rozprawa doktorska lek. Magdaleny Wołowic pt.: „*Charakterystyka kliniczna dzieci z limfocytozą hemofagocytarną*” spełnia wszystkie wymagania określone w art. 13 ust.1 „Ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym”, stawiane rozprawom doktorskim. Mam przyjemność wnioskować do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauk Medycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie lek. Magdaleny Wołowic do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Drobne uchybienia przedstawione w tekście recenzji w niczym nie obniżają olbrzymiej poznawczej wartości pracy, mającej niezwykle istotne implikacje kliniczne. **Przedstawione wyniki badań własnych Doktorantki dotyczących etiologii i przebiegu klinicznego HLH u dzieci stanowią pierwsze tego typu, unikalne opracowanie w Polsce.** Wobec bardzo wysokich walorów rozprawy doktorskiej lek. Magdaleny Wołowic wnioskuję o wyróżnienie pracy.

Prof. dr hab. Krzysztof Kałwak

Prof. dr hab. Krzysztof Kałwak
Specjalista chorób dzieci,
immunologii klinicznej,
transplantologii klinicznej,
onkologii i hematologii dziecięcej.
3470963

Krzysztof Kałwak