

Łódź, 5 czerwca 2014 r

Dr hab. med. Beata Zalewska-Szewczyk
Klinika Pediatrii, Onkologii, Hematologii i Diabetologii
I Katedra Pediatrii
Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

Recenzja

Rozprawy na stopień doktora nauk medycznych

Lekarza medycyny Dominiki Kulej

**pt. Przebieg kliniczny a wyjściowy status białek oporności wielolekowej
w leczeniu ostrej białaczki limfoblastycznej u dzieci**

Promotor: prof. dr hab. n. med. Alicja Chybicka

W ostatnich dziesięcioleciach jesteśmy świadkami ogromnego postępu w leczeniu chorób nowotworowych u dzieci. Schorzenia te, jeszcze w latach sześćdziesiątych ubiegłego wieku w większości nieuleczalne, obecnie w blisko 80% charakteryzują się dobrym rokowaniem. W szczególności przełom ten widoczny jest w dziecięcej ostrej białaczce limfoblastycznej – wydawane w Polsce w latach 60-tych podręczniki pediatrii opisywały jedynie monoterapię z zastosowaniem steroidów lub 6-merkaptopuryny, co pozwalało na uzyskanie krótkotrwałych remisji. W chwili obecnej w grupie standardowego ryzyka opisuje się ponad 90% przeżycia. Obserwowany przez nas, fascynujący postęp w tym zakresie jest wynikiem rozwoju różnych dziedzin medycyny, zarówno w zakresie diagnostyki, terapii, jak i badań podstawowych, coraz dogłębniej opisujących biologię nowotworów i wskazujących mechanizmy kancerogenezy. Współpraca między ośrodkami onkologii dziecięcej, początkowo na szczeblu narodowych grup roboczych, a obecnie od wielu lat w ramach międzynarodowych programów terapeutycznych zaowocowała dalszą poprawą wyników leczenia w tej grupie dzieci. Jednym z najistotniejszych elementów we właściwym leczeniu nowotworów dziecięcych, w tym szczególnie ostrej białaczki limfoblastycznej jest zdefiniowanie tzw. czynników niekorzystnego

rokowania. Dzięki tej wiedzy już na początku leczenia możliwe jest ustalenie tzw. grupy ryzyka, do której są kwalifikowani poszczególni pacjenci, tym samym umożliwia to zastosowanie odpowiednio dostosowanej terapii – bardziej lub mniej agresywnej. Wśród wspomnianych czynników ryzyka jednym z najbardziej istotnych jest tzw. odpowiedź na steroido- i chemioterapię. Pierwotna oporność na leczenie praktycznie może przekreślić szansę dziecka na wyleczenie z choroby, którą przecież w większości przypadków możemy określić jako uleczalną.

Jedną z możliwych przyczyn wczesnej oporności nowotworu na stosowaną chemioterapię może być tzw. pierwotna oporność wielolekowa, zależna od obecności w komórkach krwi obwodowej białek transportujących, posiadających zdolność usuwania z komórek substancji szkodliwych. Białka te obecne są również w zdrowych komórkach i odpowiedzialne są za ochronę organizmu przed ksenobiotykami, natomiast u pacjentów poddanych chemioterapii ich obecność może być przyczyną niedostatecznego działania przeciwnowotworowego cytostatyków z powodu ich zbyt niskiego stężenia w tkance nowotworowej. W takich przypadkach można spodziewać się, że standardowa chemioterapia nie będzie skuteczna i konieczne stanie się zastosowanie innych metod terapeutycznych, pozwalających na przełamanie oporności komórek białaczkowych, np. wysokodawkowanej chemioterapii z następowym przeszczepieniem szpiku kostnego. Opisane powyżej przesłanki w pełni uzasadniają przeprowadzenie założonych przez Doktorantkę badań.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska lekarz medycyny Dominiki Kulej pt. „Przebieg Kliniczny a wyjściowy status białek oporności wielolekowej w leczeniu ostrej białaczki limfoblastycznej u dzieci” obejmuje 186 stron tekstu i składa się z 6 rozdziałów w klasycznym układzie:

1. Wstęp
2. Cele pracy
3. Materiał i metody
4. Wyniki
5. Dyskusja
6. Wnioski

Praca jest bogato ilustrowana, zawiera 21 rycin, w tym 18 wykresów i 57 tabel. Tabele 15 i 16, przedstawiające ilość wykonanych analiz w grupie badanej i kontrolnej są zbędne, wobec wyczerpującej informacji w tekście. Zawarto w niej ponadto wykaz używanych skrótów, streszczenie w języku polskim i angielskim, wykaz cytowanego w rozprawie piśmiennictwa obejmującego 139 aktualnych pozycji z literatury polskiej i zagranicznej, spis tabel, wykresów, rycin i zamieszczonych zdjęć. W liczącym 45 stron wstępie doktorantka omówiła epidemiologię nowotworów wieku dziecięcego, a w szczególności charakterystykę białaczek dziecięcych oraz metody ich diagnostyki i terapii. Odrębny podrozdział poświęciła zagadnieniu niepowodzeń leczenia białaczek, w tym dokonała przeglądu dotychczasowej wiedzy na temat oporności komórek nowotworowych na stosowane leczenie oraz sposobom przełamania tego zjawiska. Opisała wybrane białka oporności wielolekowej, przedstawiając dotychczas opublikowane dane na temat ich znaczenia w ostrej białaczce limfoblastycznej. Informacje zawarte we wstępie opierają się na aktualnych, prawidłowo cytowanych doniesieniach, wskazują też, że Doktorantka posiada gruntowną znajomość zagadnienia, a szczególnie w zakresie transplantacji komórek macierzystych i oporności wielolekowej.

Doktorantka postawiła przed sobą ambitnie sformułowany cel badań, a mianowicie ocenę znaczenia ekspresji wybranych białek oporności wielolekowej: MDR-1, MDR-3, MRP-1, BCRP oraz LRP dla przebiegu klinicznego ostrej białaczki limfoblastycznej u dzieci, poprzez realizację 6 zadań badawczych, a mianowicie: oznaczenie częstości ekspresji wymienionych białek w komórkach krwi obwodowej na początku leczenia, porównanie ekspresji tych białek z danymi klinicznymi, wykrycie ewentualnego związku ekspresji wymienionych białek oporności wielolekowej ze znanymi czynnikami prognostycznymi w dziecięcych ALL oraz z kwalifikacją do grup terapeutycznych (tzw. grup ryzyka) oraz ich ewentualnego znaczenia dla powodzenia terapii. Dodatkowo Doktorantka zaplanowała porównanie przydatności 2 metod oceny ekspresji białek oporności wielolekowej: metody RT-PCR oraz metody z zastosowaniem cytofluorymetrii przepływowowej.

Cele pracy są sformułowane w sposób trafny, jasny i przejrzysty.

Do przeprowadzenia badań Doktorantka wybrała następujące białka oporności wielolekowej: tzw. klasyczne, zależne od glikoproteiny p białko MDR-

1 i MDR-3 oraz tzw. atypowe: białko MRP-1, białko oporności raka sutka BCRP oraz białko oporności raka płuc LRP. Wybór swój trafnie uzasadniła we wstępie. Doktorantka analizowała uzyskane z dokumentacji pacjentów dane kliniczne, uwzględniając obecne w chwili rozpoznania objawy kliniczne oraz istotne dla rokowania wyniki badań laboratoryjnych, jak liczbę leukocytów, stężenie hemoglobiny oraz ilość komórek białaczkowych w krwi obwodowej, ponadto immunofenotyp i ewentualną obecność antygenów mieloidalnych na komórkach białaczkowych. Ponadto analizowała obecne zaburzenia cytogenetyczne, które również mają znaczenie rokownicze. Istotnym elementem rokowniczym, w ostatnim czasie o coraz większym znaczeniu jest ocena odpowiedzi na leczenie, również uwzględniona w przedstawionej pracy, a mianowicie tzw. odpowiedź na steroidoterapię i ocena liczby komórek białaczkowych w szpiku kostnym w 15 i 33 dobie leczenia indukcyjnego. Prześledziła również dalsze losy badanych dzieci, analizując przebieg leczenia i ewentualne niepowodzenia terapii. Wybrane do analizy parametry zostały w mojej opinii dobrane w sposób właściwy i wyczerpujący. Doktorantka w sposób szczegółowy opisała metody zastosowanych analiz laboratoryjnych, wykazując rozległą wiedzę praktyczną w tym zakresie.

Grupę badaną stanowiło 25 dzieci z nowo rozpoznaną ostrą białaczką limfoblastyczną, leczonych w wiodącym w naszym kraju ośrodku onkologii dziecięcej – Klinice Transplantacji Szpiku, Onkologii i Hematologii Dziecięcej Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu. Niewielka liczebność grupy badanej jest mankamentem pracy i jak przedstawiła to sama Doktorantka, w niektórych przypadkach uniemożliwiła wykazanie istotności statystycznej. Przeprowadzona przez Doktorantkę analiza nie wykazała wpływu ekspresji białek oporności wielolekowej na obraz kliniczny ALL w chwili rozpoznania, a także związku ekspresji białek oporności wielolekowej ze znanymi czynnikami niekorzystnego rokowania, immunofenotypem komórek białaczkowych oraz z koekspresją antygenów mieloidalnych. Z uwagi na małą liczebność grupy badanej niemożliwa była analiza związku ekspresji białek oporności wielolekowej z aberracjami chromosomalnymi, stwierdzanymi u 14 pacjentów, z których to aberracji część ma uznaną wartość prognostyczną. Podobnie, niemożliwa była ocena związku ekspresji wymienionych białek z niepowodzeniem terapii, Doktorantka zaobserwowała jednak, że u pacjentów, u których doszło do nawrotu choroby, obserwowano ekspresję co najmniej 3 z 5 badanych białek.

Porównując dwie metody badania ekspresji białek oporności wielolekowej Doktorantka zaobserwowała, że metoda RT-PCR wykazała większą częstość ekspresji poszczególnych białek niż metoda oparta na cytometrii przepływową (ogółem 64% vs 16%). Na tej podstawie przyjęła, że metoda PCR jest bardziej przydatna dla oceny ekspresji wymienionych białek. W opinii recenzenta obserwacja powyższa wskazuje istotnie na wyższą czułość metody RT-PCR, jednak nie może przekreślić klinicznej przydatności cytometrii przepływowej (FCM). Jak wynika z przedstawionych w tabeli 46 wyników uzyskania remisji w 33 dobie indukcji, właśnie metoda FCM wykazała, że obecność ekspresji białek oporności wielolekowej, zwłaszcza w 15 dobie indukcji wiąże się z wysoką liczbą komórek białaczkowych w szpiku kostnym (tzw. M3 – powyżej 25%), co jest wybitnie niekorzystnym czynnikiem rokowniczym. Dodatkowo, przy porównaniu obu metod do oceny istotności statystycznej użyła testu Fischera, który przeznaczony jest dla oceny prób niezależnych. W mojej opinii należało użyć testu McNemara dla prób zależnych. Ponadto, nie mogę zgodzić się ze stwierdzeniem, że wysoka ilość limfoblastów w krwi obwodowej w dniu korelowała z obecnością ekspresji białka MRP-1 i BCRP w 1 dniu leczenia; jak wynika z tabeli 26 zanotowano podobną, a nawet wyższą ekspresję tych białek u dzieci z niższą liczbą limfoblastów. Ciekawą obserwacją Doktorantki jest większa częstość ekspresji białka MDR-3 u dzieci z ostrą białaczką limfoblastyczną, w porównaniu z grupą kontrolną. Przychylam się do zdania Doktorantki, że badania nad niezwykle istotnym zagadnieniem oporności wielolekowej w ostrej białaczce limfoblastycznej u dzieci powinny być kontynuowane, ze względu na istotne implikacje kliniczne.

W zawartej na 17 stronach dyskusji doktorantka dokonała poprawnej oceny uzyskanych wyników i skonfrontowała je z doniesieniami innych autorów, ponownie wykazując się rozległą znajomością tematu.

Doktorantka na podstawie swoich badań sformułowała 16 wniosków, z których część jest zbędna, ponieważ w istocie stanowią one powtórzenie wyników. Proponuję, aby Doktorantka dokonała korekty wniosków przed opublikowaniem pracy.

Z obowiązku recenzenta nadmieniam, że doktorantka nie ustrzegła się niedociągnięć w redakcji pracy, które powinny zostać poprawione przed publikacją w piśmiennictwie. W szczególności wykazała znaczną niechęć do

stosowania odstępów między poszczególnymi wyrazami, co nieco utrudniło czytanie pracy. Powyższe drobne uchybienia nie mają wpływu na ogólną wartość pracy, którą pod względem merytorycznym i praktycznym oceniam pozytywnie.

Reasumując, doktorantka wykazała dobre przygotowanie merytoryczne, umiejętność prawidłowego zaplanowania badania, użycia właściwych metod badawczych, prawidłowej analizy uzyskanych wyników oraz przeprowadzenia dojrzałej dyskusji. Uzyskane wnioski stanowią w mojej opinii podstawę do kontynuacji badań.

Przedstawiona rozprawa spełnia wymogi określone w aktualnej Ustawie o Stopniach i Tytule Naukowym, tym samym zwracam się do Wysokiej Rady Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu o dopuszczenie lekarza medycyny Dominiki Kulej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

dr hab. n. med.
Beata Zalewska-Szewczyk
specjalista chorób dzieci
hematologia, onkologia dziecięcej
009470

