

Ocena rozprawy doktorskiej lek. Karoliny Galant, pt.

„Polimorfizm genu *IKZF1* oraz czynnik transkrypcyjny IKAROS a ryzyko wystąpienia zaburzeń metabolicznych u chorych na ostrą białaczkę limfoblastyczną”

ALL jest najczęstszym nowotworem wieku dziecięcego (28% wszystkich nowotworów w tej grupie wiekowej) i najczęstszą postacią ostrej białaczki u dzieci (80%). W Polsce rocznie stwierdza się około 200–300 nowych zachorowań na ALL. Schorzenie to staje się poważnym problemem klinicznym oraz społecznym w populacji dziecięcej. Wielu naukowców stara się poszerzyć naszą wiedzę na temat wpływu czynników genetycznych na predyspozycję do zachorowania na ALL i ryzyko występowania powikłań u osób, które uzyskały trwałą remisję. Jednym z tych powikłań jest zespół metaboliczny. Praca lek. Karoliny Galant również dotyczy związku wybranego polimorfizmu z predyspozycją do zespołu metabolicznego u chorych na ostrą białaczkę limfoblastyczną.

Wybrany przez Autorkę dysertacji polimorfizm wykazuje działanie na układ immunologiczny człowieka. Gen *IKZF1* koduje czynnik transkrypcyjny Ikaros warunkujący dojrzewanie linii limfoidalnej i różnicowanie limfocytów B, którego defekty prowadzą do transformacji białaczkowej. Jak wskazują wyniki badań na modelach zwierzęcych, u myszy z delecją w genie *IKZF1*, skutkującą powstaniem formy białka ikaros pozbawionego domen odpowiedzialnych za wiązanie się z DNA, rozwija się agresywna forma białaczki limfoblastycznej.

Praca posiada klasyczny układ. Obejmuje 144 stron wydruku elektronicznego, podzielonych na rozdziały i podrozdziały, w tym 13 rycin i 96 tabel.

Pracę poprzedza dokładnie przedstawiony spis treści. Odszukanie poszczególnych rozdziałów i podrozdziałów nie stanowi zatem większego problemu.

Zapoznanie się z pracą ułatwia również zamieszczony, w części końcowej pracy, wykaz tabel i rycin. Pracę poprzedza także wykaz skrótów użytych w pracy. Syntetycznie przedstawione streszczenia, na 3 stronach w języku polskim oraz na 3 stronach w języku angielskim, umożliwiają zapoznanie się z zasadniczymi elementami dysertacji.

Piśmiennictwo obejmuje 119, w zdecydowanej większości najnowszych, także w zdecydowanej większości anglojęzycznych, w sposób odpowiedni cytowanych, pozycji.

Na przeprowadzenie badań uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym im. Piastów Śląskich we Wrocławiu (Nr KB-98/2019).

We wstępie, obejmującym 26 stron, podzielonym na podrozdziały Doktorantka omawia patomechanizm choroby, ze szczególnym uwzględnieniem roli predyspozycji genetycznej na występowanie ALL u dzieci. Szczegółowo omawia również historię, definicję, epidemiologię zespołu metabolicznego. Bardzo ciekawy podrozdział dotyczy zespołu metabolicznego jako powikłania po leczeniu chemioterapeutycznym. Podrozdział trzeci wstępu omawia polimorfizm genetyczny i szczegółowo podsumowuje dotychczasową wiedzę na temat roli IKZF i PAX5 w zaburzeniach metabolicznych.

Autorka we wstępie konkluduje, iż nowe i bardziej skuteczne protokoły lecznicze ALL powodują, że wzrasta liczba pacjentów, którzy w przeszłości byli leczeni z powodu tego nowotworu. Jednocześnie doskonalsze leczenie przyczynia się do pojawienia się u ozdowieńców nowych problemów, które wcześniej nie były obserwowane, takich jak zespół metaboliczny. Występowanie odległych następstw uwarunkowane jest różnymi czynnikami, w tym także predyspozycją genetyczną. Polimorfizmy genów analizowanych w przedstawionej do recenzji pracy wywierają różny wpływ na mechanizmy immunologiczne biorące udział w patogenezie ALL i rozwoju powikłań. Większość z nich nie jest nadal w pełni poznana.

Rozdział ten, wsparty nowoczesnym, odpowiednio dobranym, piśmiennictwem stanowi bardzo dobre wprowadzenie w tematykę podjętych badań. Stanowi również przekonujący dowód, iż autorka rozprawy jest dobrze przygotowana do podjętych badań.

Założone w pracy cele są sformułowane w sposób precyzyjny.

Rozdział Materiał i Metody:

Do badania włączono 95 pacjentów w wieku 5–30 lat (mediana 12,9 lat) którzy zakończyli leczenie ALL co najmniej rok przed przeprowadzeniem badań. Grupę kontrolną stanowiło 86 zdrowych osób w wieku 4,6–29,8 lat (mediana 15,1). **Zwraca uwagę fakt, że grupa badana i kontrolna różnią się pod względem średniego wieku i BMI. Różnica w zakresie wieku pomiędzy grupą badaną a kontrolną w zakresie analizy polimorfizmów genów raczej nie ma znaczenia. Średni wiek i BMI jednak może mieć, ponieważ oba są silnie związane z ryzykiem zespołu metabolicznego co stanowi przedmiot dysertacji. Proszę autorkę o komentarz.**

W grupie badanej oraz w grupie kontrolnej oceniono występowanie polimorfizmu genu *IKZF* i czynnika transkrypcyjnego *IKAROS*, stężenie glukozy, insuliny na czczo, parametry gospodarki lipidowej (cholesterolu, LDL, HDL, trójglicerydy), wyliczono wskaźniki insulinoporności i podatności na miażdżycę oraz dokonano pomiarów parametrów antropometrycznych (wysokości i masy ciała oraz BMI, obwód pasa).

Badania oceniano przed włączeniem leczenia ALL, w fazie indukcji remisji, w fazie podtrzymującej remisję, po zakończeniu leczenia, w dniu badania.

W tym miejscu rozdziału brakuje mi precyzyjnej oceny czy sformułowanie „przed rozpoczęciem leczenia ALL” oraz „w fazie indukcji remisji” oznacza czas przed rozpoczęciem sterydoterapii? Stosowanie sterydów w fazie indukcji remisji ma kardynalny wpływ na parametry gospodarki węglowodanowej i lipidowej. Proszę autorkę o komentarz

Wyniki uzyskanych badań poddano opracowaniu statystycznemu wykorzystując komputerowe pakiety programów statystycznych EPIINFO Ver. 7.2.3.1. oraz Statistica Ver. 13.3. Normalność rozkładu sprawdzano testem Shapiro-Wilka, a jednorodność wariancji testem Levene'a. Weryfikację hipotezy o równości średnich parametrów w grupach niezależnych o jednorodnej wariancji przeprowadzono metodą analizy wariancji ANOVA lub dla grup o niejednorodnej wariancji testem nieparametrycznym U Mann-Whitney'a.

Wyniki:

Tab. 13. Zastanawia mnie obecność w grupie kontrolnej osób ze skrajnie niską masą ciała i BMI (masa ciała SDS – 3,94 i BMI: 12). Powinna to być raczej grupa osób z masą ciała i BMI w granicach normy populacyjnej. Proszę autorkę o komentarz.

Tab. 14. Niestety grupy badana i kontrolna różnią się istotnie statystycznie wiekiem, 13,4 v 16,2. Różna jest też ich masa i wysokość ciała> Zarówno masa jak i wysokość ciała powinna być wyrażona SDS. Proszę autorkę o komentarz.

Tab. 15. Autorka podaje, że nieprawidłową glikemię na czczo przed rozpoczęciem leczenia obserwowała u 16 z 69 osób w grupie badanej- jak to wytłumaczyć?

Tab. 19. Autorka odnotowała skrajnie wysoką wartość glikemii na czczo u chorej/chorego w trakcie indukcji – 1131. Proszę o uściślenie, czy nadal było to próbka pobrana przed rozpoczęciem sterydoterapii? Ta wartość niewątpliwie wpłynęła na wartość p.

Błędem stylistycznym, który powtarza się w całej pracy jest użycie wyrażenia „poziom” insuliny, glikemii zamiast „stężenie”.

Tab. 26. W grupie badanej odnotowano skrajnie niskie stężenia glikemii przed leczeniem ALL- 25 mg/ dl. Odnotowano również skrajnie wysokie stężenia glikemii w trakcie indukcji remisji ALL- 1131 mg/ dl. Proszę autorkę o komentarz

Tab. 39. Autorka odnotowała skrajnie niskie stężenia HDL -cholesterolu w dniu badania 0,1. Proszę o komentarz.

Tab. 69. Autorka odnotowała skrajnie niskie stężenia HDL -cholesterolu przed rozpoczęciem leczenia – 11,0. Wpływa on niewątpliwie na p, oraz wskaźniki aterogenności. Proszę o komentarz.

Opis analizy genetycznej:

W przeprowadzonej analizie genetycznej Autorka nie stwierdziła obecności żadnego polimorfizmu genu *IKZF1* i czynnika transkrypcyjnego IKAROS w grupie badanej oraz grupie kontrolnej. Żaden z opisywanych polimorfizmów mogących predysponować do wystąpienia zaburzeń metabolicznych nie został potwierdzony. Jednakże przeprowadzona analiza genetyczna wykazała nieopisywane w literaturze zaburzenia. Stwierdzone zostały u 5 osób z obu grup, w tym u 4 osób z grupy kontrolnej (próbki numer 698, 799, 966, 574) i 1 z grupy badanej (próbka numer 583).

Jeden z polimorfizmów dotyczył skrajnie niedoborowej chorej z grupy kontrolnej. W próbce nr 574 uwidoczono amplifikację eksonów 7 i 8 genu *PAX5*.

Próbka nr 574 należała do pacjentki, która w dniu badania miała 10 lat i 2 miesiące, jej masa ciała wynosiła 20,75 kg, wzrost wynosił 125,5 cm, indeks BMI wynosił 12,8 kg/m² (BMI SDS wynosił >-2,0) i mieścił się poniżej granicy normy. **Czy zdaniem Doktorantki rozwój fizyczny tej dziewczynki może być związany ze znaną nieprawidłowością i ponownie pytanie o jej kwalifikację do grupy kontrolnej?**

Dyskusja:

Strona 122: Doktorantka przytacza swoje dane, z których wynika, że aż 40% osób z grupy kontrolnej cechuje nieprawidłowy wskaźnik HOMA. Czy mogę prosić o komentarz?

Ocena ogólna dyskusji jest bardzo dobra. Ten rozdział napisany jest syntetycznie. Uzyskane wyniki autorka konfrontuje ze spostrzeżeniami innych autorów. Porównanie wyników własnych badań z danymi piśmiennictwa wskazuje, że doktorantka posiada nie tylko doskonałą znajomość piśmiennictwa, ale potrafi również krytycznie ustosunkować się do wyników własnych badań.

Na podstawie przeprowadzonych wyników Doktorantka sformułowała 4 wnioski:

1. Wydaje się, że polimorfizm genu *IKZF1* i czynnik transkrypcyjny IKAROS nie mają wpływu na występowanie zaburzeń metabolicznych, składowych zespołu metabolicznego, w badanej grupie pacjentów. W analizowanej grupie nie stwierdziłam obecności polimorfizmu genu *IKZF-1* oraz czynnika transkrypcyjnego IKAROS u żadnego pacjenta, natomiast stwierdzono obecność polimorfizmów innych genów *CRLF2*, *CSF2RA*, *IL3RA*, *P2RY8*, *PAX 7*, *PAX8*, *PAX5*.

2. Pacjenci leczeni w dzieciństwie z powodu ostrej białaczki limfoblastycznej (ALL) charakteryzują się zwiększonym ryzykiem rozwoju zaburzeń metabolicznych, w tym zespołu metabolicznego po zakończeniu leczenia, dotyczy to szczególnie płci męskiej, w której dodatkowo częściej stwierdzano podwyższone ciśnienie tętnicze.
3. Modyfikacja nowszych wersji protokołów leczniczych przyczynia się do zmniejszenia liczby niepożądanych następstw terapii. Pacjenci leczeni zgodnie z protokołem ALL-IC 2002 charakteryzowali się zwiększonym występowaniem a zaburzeń gospodarki lipidowej oraz wyższymi wartościami glikemii na czczo w porównaniu z pacjentami leczonymi wg protokołu ALL-IC 2009.
4. Wskazane jest prowadzenie dalszych badań genetycznych, w większej grupie pacjentów, określających wpływ polimorfizmów genów *CRLF2*, *CSF2RA*, *IL3RA*, *P2RY8*, *PAX 7*, *PAX8*, *PAX5* na ryzyko wystąpienia zaburzeń metabolicznych u ozdrowieńców po zakończeniu leczenia ALL.

Poczynione przeze mnie uwagi, dotyczące metodologii, uzyskanych wyników i wniosków końcowych dysertacji w żadnym stopniu nie umniejszają wartości pracy. Doktorantka wykazała dużą wiedzę, w tym obszernym, nowocześnie ujętym i przejrzystym przedstawionym opracowaniu. Praca jest napisana piękną polszczyzną. Na uznanie zasługuje sposób prezentacji danych i szata graficzna dysertacji.

Reasumując uważam, że oceniana przeze mnie praca, pt. „Polimorfizm genu *IKZF* oraz czynnik transkrypcyjny IKAROS a ryzyko wystąpienia zaburzeń metabolicznych u chorych na ostrą białaczkę limfoblastyczną”, spełnia warunki określone w art. 13 ust.1 ustawy z dnia 14 marca 2003r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (t.j. Dz. U.Nr65, poz 595, z późn. zm.). W związku z powyższym przedkładam Radzie Dyscypliny Nauki Medyczne Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu, wniosek o dopuszczenie lek. Karoliny Galant do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ze względu na nowatorski charakter badań Doktorantki wnioskuję również o wyróżnienie jej pracy.

dr hab. n. med. Elżbieta Petriczko
specjalista chorób dziecięcych,
endokrynologii i metabolologii dziecięcej
endokrynolog
2179811