

Lublin, 12.04.2021r.

Prof. dr hab. n. med.
Wanda Furmaga-Jabłońska
Kierownik I Katedry Pediatrii
i Kliniki Patologii Noworodków i Niemowląt
Uniwersytetu Medycznego w Lublinie

RECENZJA

ROZPRAWY DOKTORSKIEJ LEK. MED. DOMINIKI JEDLIŃSKIEJ-PIJANOWSKIEJ
pt. „**CZYNNIKI WPLYWAJACE NA OBRAZ KLINICZNY I LECZENIE
WRODZONEGO ZAKAZENIA WIRUSEM CYTOMEGALII**”

PROMOTOR: DR HAB. N. MED. JUSTYNA CZECH-KOWALSKA PROF. IPCZD
ZLECONA NA PODSTAWIE UCHWAŁY RADY NAUKOWEJ INSTYTUTU „POMNIK-
CENTRUM ZDROWIA DZIECKA” NR 6/I/2019 Z DNIA 17 STYCZNIA 2019 r.

Wrodzona cytomegalia (wCMV) jest najczęstszym zakażeniem wewnątrzmacicznym rozpowszechnionym na całym świecie, a częstość jej występowania waha się od 0,6% populacji w krajach rozwiniętych do nawet 5% w krajach trzeciego świata. W Unii Europejskiej i Stanach Zjednoczonych rodzi się rocznie 60 000 noworodków z wCMV. Koszty związane z wCMV jakie ponosi społeczeństwo są znaczne, ponieważ jest to wiodąca niegenetyczna przyczyna niedosłuchu zmysłowo-nerwowego i zaburzeń neurorozwojowych u dzieci. Mimo istotnego znaczenia klinicznego i powinowactwa do układu nerwowego wCMV często przebiega bezobjawowo: 85-90% zakażonych noworodków nie ma objawów po urodzeniu a metody skriningowe nie są powszechnie stosowane. Późne powikłania neurologiczne rozwijają się u 35-60% noworodków z objawową cytomegalią i u 5-25% noworodków bezobjawowych. Do chwili obecnej nie ma metod profilaktycznych zapobiegających transmisji zakażenia od matki do płodu. Tak więc podejmowanie badań poszukujących czynników prognostycznych, oraz wpływających na obraz kliniczny i przebieg wCMV jak i umożliwiających postępy w diagnostyce oraz doskonalenie metod leczenia jest niezwykle istotne ze względów klinicznych i populacyjnych.

Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska lek. med. Dominiki Jedlińskiej-Pijanowskiej pt.: „*Czynniki wpływające na obraz kliniczny i leczenie wrodzonego zakażenia wirusem cytomegalii*” dotyczy istotnego poznawczo oraz praktycznie zagadnienia mającego

na celu ocenę wpływu wybranych polimorfizmów pojedynczego nukleotydu (SNPs) genów kodujących cytokiny i receptory na obraz kliniczny i leczenie noworodków z wrodzonym zakażeniem wirusem cytomegalii. Doktorantka wysuwa hipotezę, że wyniki badań pozwolą lepiej zrozumieć osobnicze różnice w przebiegu infekcji, a także umożliwią wybór terapii spersonalizowanej, przynoszącej najlepsze efekty w postaci skrócenia czasu hospitalizacji i uzyskania istotnego obniżenia wirerii u dzieci z cytomegalią wrodzoną.

Cel główny jaki postawiła sobie doktorantka, tj. ocena czynników wpływających na obraz kliniczny i leczenie noworodków z wrodzonym zakażeniem wirusem cytomegalii został zrealizowany poprzez 3 cele szczegółowe:

1. Ustalenie związku ośmiu polimorfizmów pojedynczego nukleotydu (SNPs) genów kodujących cytokiny i receptory (IL1B rs16944, IL12B rs3212227, IL28Brs12979860, CCL2 rs1024611, DC-SIGN rs735240, TLR2 rs5743708, TLR4rs4986791, TLR9 rs352140) z ryzykiem wrodzonego zakażenia wirusem cytomegalii oraz z objawowym przebiegiem choroby.

2. Ustalenie związku ośmiu polimorfizmów pojedynczego nukleotydu (SNPs) genów kodujących cytokiny i receptory (IL1B rs16944, IL12B rs3212227, IL28Brs12979860, CCL2 rs1024611, DC-SIGN rs735240, TLR2 rs5743708, TLR4rs4986791, TLR9 rs352140) z wirurią oraz wirurią u noworodków z wrodzonym zakażeniem wirusem cytomegalii.

3. Porównanie dwóch metod leczenia noworodków z wrodzonym zakażeniem wirusem cytomegalii: terapii opartej na Gancyklowirze (wyłącznie dożylna lub sekwencyjna) oraz terapii opartej wyłącznie na doustnym Walgancyklowirze.

Cel pracy ma niezwykle istotny aspekt zarówno poznawczy jak i praktyczny, ponieważ do chwili obecnej nie znane są czynniki ani mechanizmy, od których zależy przebieg kliniczny cytomegalii wrodzonej i różnorodność obrazu klinicznego począwszy od form bezobjawowych do najcięższych postaci septycznych, wielonarządowych, przebiegających i/lub z zajęciem układu nerwowego z odległymi konsekwencjami zdrowotnymi oraz reakcja na zastosowane leczenie przeciw-wirusowe.

Rozprawę doktorską stanowi cykl 4 publikacji monotematycznych pod wspólnym tytułem „Czynniki wpływające na obraz kliniczny i leczenie...

Standardy Medyczne/Pediatrics: 2019; T.16; 766-771

Charakt. merytoryczna wg PBN: Artykuł przeglądowy

Język publikacji: PL

Punkty MNiSW: 5

2. Association between single nucleotide polymorphisms (SNPs) of IL1, IL12, IL28 and TLR4 and symptoms of congenital cytomegalovirus infection

Dominika Jedlińska-Pijanowska, Beata Kasztelewicz, Justyna Czech-Kowalska, Maciej Jaworski, Klaudia Charusta-Sienkiewicz, Anna Dobrzańska

PLoS One. 2020;15(5):1-22; doi.org/10.1371/journal.pone.0233096

Charakt. merytoryczna wg PBN: Oryginalny artykuł naukowy

Język publikacji: EN

Punkty MNiSW: 100

Impact Factor: 2.740

3. Association between single nucleotide polymorphisms (SNPs) and viral load in congenital cytomegalovirus infection

Dominika Jedlińska-Pijanowska, Beata Kasztelewicz, Anna Dobrzańska, Katarzyna

Dzierżanowska-Fangrat, Maciej Jaworski, Justyna Czech-Kowalska

JMotherandChild.2020;24(4):1-15;doi:10.34763/jmotherandchild.20202404.d-20-00014;
in press

Charakt. merytoryczna wg PBN: Oryginalny artykuł naukowy

Język publikacji: EN

Punkty MNiSW: 20

4. Antiviral treatment in congenital HCMV infection: The six-year experience of a single neonatal center in Poland

Dominika Jedlińska-Pijanowska, Justyna Czech-Kowalska, Magdalena Kłodzińska,

Aleksandra Pietrzyk, Eliza Michalska, Kinga Gradowska, Anna Dobrzańska, Beata

Kasztelewicz, Dariusz Grusfeld

Adv Clin Exp Med. 2020;29(10):1161–1167; doi:10.17219/acem/125427

Charakt. merytoryczna wg PBN: Oryginalny artykuł naukowy

Język publikacji: EN

Punkty MNiSW: 40

Impact Factor: 1.514

Sumaryczny wskaźnik IF:4.254

Sumaryczna punktacja MNiSW: 165

Oprawiony wolumin wydrukowanej pracy liczy 142 ponumerowane strony tekstu o typowym układzie redakcyjnym. Spis treści zawiera: wykaz stosowanych skrótów, nazwę i numer projektu badawczego, streszczenie w języku polskim i angielskim, słowa kluczowe, wstęp, cel pracy, a następnie wykaz i odbitki 4 publikacji stanowiących podstawę pracy doktorskiej ilustrowane 4 rycinami i 29 tabelami. Kończącą część rozprawy doktorskiej stanowi omówienie wyników badań, podsumowanie i wnioski. W pracy umieszczono również oświadczenia współautorów o indywidualnym wkładzie pracy w powstawaniu kolejnych artykułów oraz zgodę komisji bioetycznej na przeprowadzenie projektu badawczego. Spis piśmiennictwa liczy 110 pozycji literatury fachowej, w tym polskich (11 pozycji) i zagranicznych autorów (99 pozycji). Większość cytowanego piśmiennictwa to prace opublikowane po roku 2002, a 41 prac pochodzi z ostatnich 5 lat.

We wstępie na podstawie bogatego piśmiennictwa Doktorantka w sposób zwarty i uporządkowany omówiła epidemiologię zakażenia i obraz kliniczny wrodzonej cytomegalii ze szczególnym uwzględnieniem powikłań ze strony układu nerwowego (małogłowie, zaburzenia napięcia mięśniowego, opisthotonus, drgawki, niedosłuch zmysłowo-nerwowy, zapalenie siatkówki, naczyniówki, MPDz, autyzm, padaczka, zaburzenia poznawcze) oraz zaburzenia narządowe (niewydolność szpiku kostnego, zapalenie wątroby, hepatosplenomegalia, trombocytopenia, żółtaczką). W dalszej części wstępu Doktorantka zwięźle przedstawiła aktualne metody diagnostyki i leczenia cytomegalii wrodzonej. Autorka zawarła również we wstępie szczegółowe informacje dotyczące czynników wpływających na przebieg wrodzonego zakażenia wirusem cytomegalii i jasno uzasadniła powód podjęcia badań nad tymi czynnikami. Sposób zaprezentowania aktualnej wiedzy dowodzi bardzo dobrego przygotowania merytorycznego Doktorantki do podjęcia samodzielnych badań. Rozdział ten stanowi dobry punkt odniesienia do sformułowania celu pracy, który został sformułowany jasno i precyzyjnie.

Cztery załączone publikacje stanowiące podstawę rozprawy doktorskiej o łącznym **IF: 4,254 i punktacji MNiSW: 165** są pracami monotematycznymi dotyczącymi wpływu czynników na obraz kliniczny i leczenie wrodzonego zakażenia wirusem cytomegalii. W załączonych pracach Doktorantka scharakteryzowała w sposób wyczerpujący badaną grupę noworodków oraz metody badań genetycznych i statystycznych. Badaną grupę noworodków wyodrębniono prawidłowo na podstawie jasno sformułowanych kryteriów włączenia i wyłączenia. Do badania włączono 233 pacjentów hospitalizowanych w Klinice Neonatologii, Patologii i Intensywnej Terapii Noworodka IPCZD w latach 2016-2019 (92 pacjentów z potwierdzonym zakażeniem wCMV oraz 141 pacjentów stanowiących grupę

kontrolną). Wykorzystane w pracy metody badań genetycznych i statystycznych nie budzą zastrzeżeń. Wyniki zebranych danych opracowano za pomocą adekwatnych analiz statystycznych, tj. po sprawdzeniu normalności rozkładu za pomocą testu Shapiro-Wilka. Ze względu na brak normalnego rozkładu badanych cech w populacji, w obliczeniach statystycznych zastosowano testy nieparametryczne. Rezultaty obliczeń statystycznych zostały prawidłowo zinterpretowane, za istotne statystycznie uznano wartości cech różniące się na poziomie $p \leq 0,05$.

Pierwsza praca pogładowa, pt: „**Rola nieswoistej odpowiedzi immunologicznej we wrodzonym zakażeniu wirusem cytomegalii (The role of innate immunity in congenital cytomegalovirus infection)**” prezentuje aktualną wiedzę dotyczącą wpływu polimorfizmów SNPs na indywidualną, nieswoistą odporność immunologiczną i przebieg kliniczny wrodzonej cytomegalii. Doktorantka podkreśliła w swojej pracy, że w literaturze światowej badania polimorfizmów SNP genów kodujących interleukiny, chemokiny, czy receptory PRRs u noworodków z wCMV ograniczają się obecnie tylko do kilku doniesień, co stanowi istotny powód do podjęcia dalszych badań w tym zakresie aby lepiej zrozumieć patomechanizm powstawania objawów i różnorodność obrazu klinicznego, co może mieć również istotne znaczenie prognostyczne.

Dwie kolejne, oryginalne, prospektywne publikacje (artykuł nr 2 i 3) prezentują związki zależności pomiędzy badanymi polimorfizmami SNPs (IL1B rs16944, IL12B rs3212227, IL28B rs12979860, CCL2 rs1024611, DC-SIGN rs735240, TLR2 rs5743708, TLR4 rs4986791, TLR9 rs352140) a ryzykiem cCMV, objawowym przebiegiem choroby, poszczególnymi objawami zakażenia oraz liczbą kopii DNA wirusa we krwi i w moczu.

W drugim artykule (oryginalny artykuł naukowy) pt.: „**Association between single nucleotide polymorphisms (SNPs) of IL1, IL12, IL28 and TLR4 and symptoms of congenital cytomegalovirus infection**” Doktorantka przedstawiła wyniki badań, w których stwierdziła brak zależności pomiędzy analizowanymi polimorfizmami genetycznymi SNPs i ryzykiem wCMV, a objawowym przebiegiem zakażenia w oparciu o przyjęte kryteria. Wyniki badań potwierdziły natomiast związek między czterema polimorfizmami genetycznymi SNPs (IL1B rs16944, IL12B rs3212227, IL28B rs12979860, TLR4 rs4986791) oraz poszczególnymi objawami wCMV, takimi jak: wcześniactwo, splenomegalia, małopłytkowość oraz zapalenie wątroby.

W trzeciej pracy (oryginalny artykuł naukowy) pt: „**Association between single nucleotide polymorphisms (SNPs) and viral load in congenital cytomegalovirus**

infection” Autorka analizowała zależność pomiędzy polimorfizmem SNP IL12B rs3212227 a liczbą kopii wirusa we krwi i w moczu u noworodków z wCMV. Na podstawie wyników badań Doktorantka stwierdziła, że heterozygoty T/G mają predyspozycję do wyższej wirurii w stosunku do homozygot T/T, natomiast allel T w stosunku do allela G predysponuje do wyższej wiremii u noworodków o objawowym przebiegu zakażenia.

W czwartej publikacji (oryginalna, retrospektywna), pt: **„Antiviral treatment in congenital HCMV infection: The six-year experience of a single neonatal center in Poland”** Doktorantka przedstawiła doświadczenia Kliniki Neonatologii, Patologii i Intensywnej Terapii Noworodka IPCZD w leczeniu noworodków z wCMV. Początkowo w leczeniu stosowano dożylny Gancyklovir (GCV) lub leczenie sekwencyjne, natomiast w kolejnych latach obserwacji stwierdzono korzyści wynikające z doustnego leczenia przeciwwirusowego. W pracy Doktorantka porównała metody leczenia przeciwwirusowego stosowane u 98 noworodków z objawowym cCMV w latach 2012-2017 w Klinice Neonatologii, Patologii i Intensywnej Terapii Noworodka IPCZD. Pierwszą grupę stanowili pacjenci otrzymujący dożylny GCV (wyłącznie GCV lub w formie terapii sekwencyjnej z VGCV). Drugą grupę stanowili pacjenci, u których stosowano wyłącznie doustną postać leku (VGCV). W swoich badaniach Doktorantka potwierdziła, że monoterapia VGCV stała się leczeniem z wyboru w leczeniu pacjentów z wCMV. Wyniki badań wskazują, że monoterapia VGCV w porównaniu do monoterapii GCV, pozwala skrócić czas hospitalizacji ponad 6-krotnie oraz uzyskać istotne obniżenie wiremii (ponad 70-krotnie). Autorka podkreśliła, że terapia sekwencyjna jest nadal optymalna dla noworodków z ciężką postacią zakażenia wCMV oraz dla noworodków, które nie tolerują karmienia enteralnego. Na uwagę zasługuje również fakt, że podczas leczenia doustnego VGCV rzadziej obserwowano u pacjentów klinicznie istotne powikłanie w postaci głębokiej neutropenii.

Uzyskane przez Doktorantkę wyniki budzą zainteresowanie nie tylko ze względu na ich nowatorski charakter. Mając do dyspozycji grupę noworodków z wrodzoną cytomegalią o różnym przebiegu klinicznym oraz wyniki badań genetycznych 8 polimorfizmów pojedynczych nukleotydów genów kodujących interleukiny i receptory w cytomegalii wrodzonej Autorka rozprawy przeprowadziła skrupulatną analizę statystyczną dotyczącą asocjacji różnych parametrów. Jednocześnie Doktorantka dokonała analizy retrospektywnej i porównała dwie metody leczenia noworodków z wCMV w okresie 6-letniej obserwacji. Spośród uczynionych obserwacji za najbardziej istotne uznaje wnioski od 2 do 4, tj.:

- 2. Polimorfizmy SNPs IL1B, IL12B, IL28B oraz TLR4 mają wpływ na obraz kliniczny wrodzonej cytomegalii:

- a. Polimorfizm SNP IL12B rs3212227 zmniejsza ryzyko wcześniactwa o 63%, zaś polimorfizm SNP IL1B rs16944 zmniejsza ryzyko splenomegalii o 64%.
- b. Polimorfizm SNP IL28B rs12979860 zwiększa ryzyko małopłytkowości ponad dwukrotnie, a polimorfizm SNP TLR4 rs4986791 prawie 8-krotnie zwiększa ryzyko zapalenia wątroby.
- 3. Polimorfizm SNP IL12B rs3212227 predysponuje do wyższej aktywności replikacyjnej wirusa, co może przekładać się na objawowy przebieg wrodzonej cytomegalii.
 - 4. Leczenie walgancyklowirem umożliwia długotrwałe hamowanie aktywności replikacyjnej wirusa, pozwala skrócić czas hospitalizacji oraz zmniejszyć ryzyko działań niepożądanych w postaci głębokiej neutropenii.

W rozdziale pt. „Podsumowanie i wnioski” Autorka podjęła udaną próbę interpretacji własnych badań w konfrontacji z rezultatami zbliżonych tematycznie badań innych autorów. Przytaczając prace innych autorów Doktorantka podkreśliła podobne do własnych wnioski i spostrzeżenia dotyczące roli badań polimorfizmów SNPs w identyfikowaniu genetycznych czynników predysponujących do wewnątrzmacicznego zakażenia wirusem cytomegalii. Szczególnym, nowatorskim osiągnięciem Doktorantki jest powiązanie określonych polimorfizmów SNPs z przebiegiem klinicznym zakażenia i predyspozycją do zwiększonego ryzyka małopłytkowości i zapalenia wątroby oraz wyższej aktywności replikacji wirusa. Inne badane polimorfizmy natomiast zmniejszają ryzyko wcześniactwa i splenomegalii. Moim zdaniem na podkreślenie zasługuje również wartość prognostyczna określonych przez Doktorantkę polimorfizmów genetycznych co do przebiegu klinicznego wCMV. Należy podkreślić, że genotypowanie polimorfizmów SNP w cytomegalii wrodzonej może stać się w przyszłości podstawą do podjęcia spersonalizowanego leczenia. Na szczególną uwagę klinicystów zasługują również wyniki 6-letniej analizy metod leczenia cytomegalii wrodzonej, które wykazują przewagę leczenia doustnego nad terapią dożylną, co powinno być uznane za standard leczenia i wdrożone do terapii klinicznej we wszystkich oddziałach patologii noworodka w Polsce.

Wnioski pracy odpowiadają na cele, które Doktorantka postawiła sobie przystępując do realizacji zadań. W mojej opinii mają dużą wartość poznawczą potwierdzając konieczność genotypowania polimorfizmów SNP w cytomegalii wrodzonej, które jednocześnie mogłyby służyć jako wykładniki prognostyczne przebiegu zakażenia w tej grupie dzieci i przyczynić się do rozwoju terapii spersonalizowanej.

Należy podkreślić, że przedstawiona mi do oceny praca doktorska jest pracą nowatorską i dowodzi ogromnej wiedzy Autorki w zakresie prowadzonych dociekań naukowych. Pragnę również podkreślić, że oprócz walorów merytorycznych praca jest napisana w sposób bardzo komunikatywny, starannie i czytelnie, poprawnym językiem z zachowaniem profesjonalnego nazewnictwa.

Sumując moje spostrzeżenia i refleksje poczynione w trakcie lektury rozprawy doktorskiej pt.: „Czynniki wpływające na obraz kliniczny i leczenie wrodzonego zakażenia wirusem cytomegalii”, stwierdzam, że spełnia ona kryteria stawiane rozprawom doktorskim i przedstawiam Radzie Naukowej Instytutu „Pomnik-Centrum Zdrowia Dziecka” w Warszawie wniosek o dopuszczenie jej Autorki lek. med. Dominiki Jedlińskiej-Pijanowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie składam wniosek do rady Naukowej Instytutu „Pomnik-Centrum Zdrowia Dziecka” o wyróżnienie pracy.

K I E R O W N I K
I Katedry Pediatrii
i Kliniki Patologii Noworodków i Niemowląt
W. Furmaga - Jabłońska
Prof. dr hab. Wanda Furmaga-Jabłońska

Prof. dr hab. n. med.

Wanda Furmaga-Jabłońska