Wpłynęło dn. 2016. 09. 01.
Nr ewidencyjny 1878
do Jpoczyczu

Łódź, 15.07.2016

Prof. dr hab. n. med. Janusz Wendorff
Klinika Neurologii
Instytut Centrum Zdrowia Matki Polki

Recenzja pracy doktorskiej
Lek. Med. Alicji Kozera-Kępniak
Wybrane polimorfizmy pojedynczych nukleotydów PXR (Preganex receptor) a padaczka lekooporna.

Z prawdziwą satysfakcją zapoznałem się z pracą doktorską lek. Alicji Kozera-Kępniak, głównie ze względu na tematykę podjętą w dysertacji doktorskiej, która jest mi bliska i stanowią ją unikalne badania nad genetyką padaczki lekoopornej. Od około 50 lat prowadzone są badania dotyczące związku występowania padaczki i jej niekorzystnego przebiegu z zmianami genetycznymi na różnym poziomie. Dotychczas jednak badania genetyczne nie w pełni weszły do praktyki klinicznej populacji chorych na padaczkę. Badania genetyczne w padaczce mają zastosowanie w diagnostyce padaczki lub konkretnego zespołu padaczkowego, co jest już stosowane u dzieci ze względu na konieczność prawidłowego wyboru skutecznego leku (np. w zespole Dravet z mutacją SCN1A wysoka skuteczność stiripentolu, w padaczce częściowej łagodnej zespół Panayiotopoulos wykazują szczególną skuteczność kwasu walproinowego itcl.) W naukowych zagranicznych standardach dziecięcych encefalopatii padaczkowych jest zalecane wykonanie badania genetycznego w ośrodkach III referencji.

Najczęściej jednak dotychczas badania genetyczne służyły rozpoznaniu zespołu chorobowego genetycznego, którego padaczka jest objawem. Pomimo wielu prac nad genetyką padaczki lekoopornej nie wprowadzono do postepowania medycznego chorego z takim niekorzystnym przebiegiem padaczki propozycji badań genetycznych i ich algorytmu w standardach medycznych. Tym bardziej przedstawione przez doktorantkę badania u chorych na padaczkę dotyczą polimorfizmu genów o szerokim wpływie na inne geny i substancje regulatorowe jak PXR są ważne z punktu widzenia postępu wiedzy i potencjalnie praktyki medycznej.

Określenie ryzyka genetycznego (termin użyty przez doktorantkę) niekorzystnego przebiegu padaczki zwłaszcza w przypadkach, które spełniają kliniczne kryteria padaczki lekoopornej, a nie wykazują objawów zwykle towarzyszących niekorzystnemu jej przebiegowi, należy do jednego z największych oczekiwań lekarzy praktyków w stosunku do nauki dotyczącej genetyki padaczki lekoopornej.

Tak wiec wybór tematu przez doktorantkę jest ambitny i odpowiada zapotrzebowaniu zarówno nauki jak i neurologii klinicznej. Cele pracy (str.35) jasno wskazują, że badaczka koncentruje się nie tylko na teoretycznej stronie zagadnienia, jakim jest sprawdzenie, czy dwa wybrane polimorfizmy genu PXR są genetycznym determinantem lekooporności w padaczce, ale także na kliniczno praktycznym, który zakładałby możliwość wytypowania genotypu, jako czynnika ryzyka lekooporności, a także oznaczenia korelacji genetyczno-klinicznych z objawami, przebiegiem i leczeniem padaczki.

Szczególnym oryginalnym osiągnieciem lek. med. Alicji Kozery-Kępniak jest podjęcie badań nad występowaniem w padaczce lekoopornej dotychczas niebadanych pod tym katem polimorfizmów genu PXR.

Gen ten, jak to słusznie podaje doktorantka w części wstępnej wprowadzającej do badań własnych (40 stron), jest związany z funkcją receptora PXR i pośredniczy w regulacji około 150 genów, które są zaangażowane w farmakokinetycznym profilu działania leków przeciwpadaczkowych.

W tym aspekcie lek. Med. Alicja Kozera-Kepniak słusznie wspomina we wstępie pracy doktorskiej o wpływie genów metabolizmu leków przeciwpadaczkowych, które podlegają z kolei regulacji przez gen PXR.
Wiedza na temat polimorfizmów układu P-450, genu $ABCB_1$, UGT1A1, UGT2B7 i SCN1A rozwija się bardzo dynamicznie a wpływ tych polimorfizmów w padaczce lekoopornej nie jest jednoznaczny. Uważam, że w publikacji po doktoracie autorka powinna obok własnych wyników nad polimorfizmem PXR przybliżyć te wiadomości neurologom w aspekcie wpływu tych polimorfizmów na lekooporność, ze względu liczne kontrowersje dotyczące tego tematu. Zacytowanie również badań Sanahez i wsp. (Seizure 2010) byłoby korzystne. W większości zagadnienia te przedstawione są w sposób adekwatny i przejrzysty przez doktorantkę we wstępnych rozdziałach pracy.

Cele postawione przez autorkę w pracy na stopień doktora nauk medycznych,

jak już podkreślałem, są ambitne i precyzyjnie sformułowane. Dotyczą sprawdzenia czy dwa badane polimorfizmy genu hPXR są genetycznym determinantem lekooporności w padaczce, czy występowaniu tego genotypu, istotnie mogłoby być uważane za czynnik ryzyka padaczki lekoopornej, a także ustaleniu pewnych istotnych korelacji kliniczno-genetycznych.

Materiał i Metody przedstawione w rozdziale IV, a zastosowane przez doktorantkę w realizacji badania, oceniam pozytywnie. W tym aspekcie szczególnie wartościowe jest przejęcie przez autorkę współczesnej definicji padaczki lekoopornej wg. Międzynarodowej Ligii Przeciwpadaczkowej, zastosowane kryteria doboru pacjentów, zastosowanie prawidłowych metod laboratoryjnej identyfikacji polimorfizmów, oraz wybór i zastosowanie metod statystycznych.

Autorka, w sposób przekonywujący i potwierdzający jej dojrzałość naukową, podaje przyczyny, dla których zrezygnowano z analizy grupy pacjentów dobrze poddających się leczeniu. Podobne wyjaśnienia są zawarte również w dyskusji, są one przekonywujące dla recenzenta zwłaszcza, że korelacje kliniczno-genetyczne (obecność większego odsetka charakterystycznych polimorfizmów w grupie z najczęściej występującymi napadami) przemawiają, że badane polimorfizmy są charakterystyczne dla padaczki niekorzystnie poddającej się leczeniu.

Wyprzedzając kolejność oceny poszczególnych części pracy doktorskiej, uważam, że ten ostatni aspekt należałoby podkreślić dyskusji i może ująć we wniosku.

Na 20 stronach przedstawione są wyniki pracy. Obejmują one na wstępie sprawdzenie zgodności rozkładów genotypów z prawem Hardyego-Weinberga. Są one zgodne z wspomnianym prawem równowagi genetycznej zarówno w grupie badanej jak i grupie kontrolnej. Przeprowadzenie testu zgodności genotypów z prawem Hardyego-Weinberga świadczy korzystnie o przygotowaniu naukowym i warsztatowym lek. med. Alicji Kozery-Kępaniak do prac genetyczno-klinicznych i zwiększa wiarygodność uzyskanych przez nią wyników. Porównanie części występowania genotypów analizując dwa z wybranych polimorfizmów genu PXR wskazuje na różna ich częstość (znaczenie?) w padaczce lekoopornej.

Genotyp CC polimorfizmu 66034T/C i kombinacja genotypu CC/AA polimorfizmu 69789A/G występowała znacznie częściej w padaczce lekoopornej niż w grupie kontrolnej. Wyniki te jak i pozostałe dotyczące korelacji kliniczno-genetycznych są właściwie przedstawione w tabelach, wykresach i omówione w

miejscu ich prezentacji, co wpływa na czytelność dla oceniającego i ewentualnego czytelnika.

Z punktu widzenia recenzenta analiza korelacji miedzy genotypem a częstotliwością napadów jest szczególnie wartościowym wynikiem, gdyż wskazuje ona, że występowanie genotypu CC predysponowało do zwiększenia częstości napadów i wynik ten uzyskały wysoką znamienność statystyczną. Jak wspomniałem poprzednio w recenzji, jest to główny dowód na fakt, że stwierdzone zmiany genetyczne dotyczą padaczki z częstymi napadami tj. lekoopornej a nie padaczki z ich niewielką liczbą, czyli dobrze poddającej się leczeniu.

Wysoka liczba stosowanych leków przeciwpadaczkowych odzwierciedla trudności leczących z uzyskaniem poprawy częstotliwości napadów i jest charakterystyczna dla leczenia pacjentów z padaczka lekooporną. Brak istotnej różnicy częstości występowania badanych polimorfizmów u stosujących 2 lub 3 leki przeciwpadaczkowe wymaga nieco „szerszej" oceny w rozdziale *Dyskusja.* Jak wiadomo ekspresja genów zależy od innych czynników genetycznych i środowiskowych. Można by również, (choć tylko teoretycznie) w dyskusji odnieść się do problemu skuteczności leczenia poszczególnymi lekami przeciwpadaczkowymi, rodzajem metabolizmu leków np. po przez układ cytochromu (P.450 lub nie) a częstością występowania ewentualnych polimorfizmów genu PXR. Politerapia typowo stosowana u pacjentów w padaczce lekoopornej uniemożliwia oczywiście przeprowadzenie praktycznej oceny takich korelacji. Nie podjęcie teoretycznej dyskusji na temat polimorfizmu PXR a leki stosowane, w żadnym stopniu nie jest istotnym zarzutem w stosunku do doktorantki.

Dyskusja w całości jest przeprowadzona prawidłowo z odniesieniem się do własnych wyników i prawidłowo cytowanego piśmiennictwa światowego. Należy pozytywnie podkreślić, że autorka korzystała w tym względzie z bardzo bogatego (152 pozycje) najnowszego piśmiennictwa a także, co dość rzadko zdarza się w pracach doktorskich, innych polskich autorów.

Szczególnie wartościowe są stwierdzenia autorki pracy doktorskiej zawarte w końcowej części dyskusji podkreślające znaczenie przeprowadzonych badań i płynących z nich wniosków. Po raz pierwszy do genetycznych determinantów lekooporności w populacji europejskiej wykorzystując badania lek. Med. Alicji Kozery- Kępniak można zaliczyć polimorfizm 66034CThPXR. Od strony

oceniającego pracę chciałbym podkreślić, ze badania tego polimorfizmu może mieć znaczenie w konstrukcji przydatnego algorytmu wykorzystanych badań genetycznych, jako ważne, inicjujące badanie oceny genetycznej w padaczce lekoopornej (wpływ regulatorowy genu PXR na znaczną liczbę genów mogących mieć znaczenie w metabolizmie leków przeciwpadaczkowych).

Pięć wniosków jest dobrze udokumentowanych i prawidłowo sformułowanych, i są one w pełni odzwierciedleniem wyników uzyskanych w pracy. Zastosowane przez autorkę formy wskazujące na ich prawdopodobieństwo („może mieć wpływ", „może być", „może stanowić", itd.) świadczą o bardzo dobrym przygotowaniu doktorantki do prezentacji wyników własnych prac i osiągnieć naukowych.

Biorąc pod uwagę całość pracy doktorskiej, przede wszystkim uzyskane nowatorskie wyniki naukowe doktorantki mogące mieć potencjalny wpływ na postepowanie diagnostyczne w padaczce, zwracam się do Wysokiej Rady Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego o przyznanie wyróżnienia pracy doktorskiej lek. Med. Alicji Kozera – Kępniak i wnioskuję o dopuszczenie Jej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Prof. dr hab. n. med.

Janusz Wendorff

5625861

Profesor
dr hab. n. med. Janusz Wendorff
specjalista neurologii
i neurologii dziecięcej
Łódź, ul. Kosynierów Gdyńskich 25 m. 7
tel. 042 678 39 54