

dr hab. n. med. i n. o zdr. Krzysztof Czyżewski, prof. UMK  
Katedra Pediatrii, Hematologii i Onkologii  
Collegium Medicum im. L. Rydygiera w Bydgoszczy  
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu  
85-094 Bydgoszcz, ul. M. Curie-Skłodowskiej 9  
Tel 52-585-48-60, Fax. 52-585-47-56  
e-mail: k.czyzewski@cm.umk.pl



Bydgoszcz, 17 września 2023 roku

### Recenzja

rozprawy doktorskiej lek. Małgorzaty Nowak

pt. *„Analiza związku stężeń chemokin receptora CXCR3 z przebiegiem klinicznym gorączki neutropenicznej u dzieci”*

Uchwałą Rady Dyscypliny Nauk Medycznych Uniwersytetu Medycznego w Łodzi zostałem powołany na recenzenta rozprawy doktorskiej lekarz Małgorzaty Nowak, zatytułowanej *„Analiza związku stężeń chemokin receptora CXCR3 z przebiegiem klinicznym gorączki neutropenicznej u dzieci”*. Praca została przygotowana pod opieką naukową Promotora, dr hab. Joanny Trelińskiej, prof. UM, w Klinice Pediatrii, Onkologii i Hematologii Dziecięcej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi.

#### 1. Ocena merytoryczna

##### Trafność podjętej tematyki badawczej i jej oryginalność

Intensywna chemioterapia prowadzona u dzieci z chorobami nowotworowymi i upośledzenie funkcji układu krwiotwórczego, sprawia że najwyższe ryzyko infekcji, a w szczególności sepsy występuje u pacjentów leczonych z powodu nowotworów hematologicznych. Istotne znaczenie we wzroście ryzyka ciężkiego zakażenia odgrywają: uszkodzenie bariery śluzówkowej, zaburzenia składu mikrobioty pacjenta (skóry, przewodu pokarmowego), stosowanie stałych dostępów naczyniowych (cewniki centralne, porty) czy niedożywienie. Neutropenia, występująca u 30-50% dzieci leczonych chemioterapią z powodu nowotworu jest głównym czynnikiem ryzyka rozwoju infekcji. W okresie neutropenii gorączka jest sygnałem alarmowym rozwijającego się zakażenia. Wg danych literaturowych w 49-67% przyczyną epizodów gorączki w neutropenii jest zakażenie udokumentowane klinicznie bądź mikrobiologicznie, a w pozostałych przypadkach gorączki neutropenicznej nie udaje się ustalić jej przyczyny – mamy wtedy do czynienia z gorączką

o nieustalonej etiologii (FUO, *ang. fever of unknown origin*). W chwili obecnej nie zdefiniowano klarownych kryteriów kwalifikujących pacjenta do grupy wysokiego ryzyka ciężkiego przebiegu gorączki neutropenicznej, w tym sepsy. Jednak wiadomo, że u pacjentów po allogenicznej transplantacji komórek krwiotwórczych (allo-HCT, *ang. allogeneic hematopoietic cell transplantation*), u pacjentów w trakcie leczenia z powodu ostrych białaczek, pacjentów z neutropenią trwającą powyżej 7 dób, z towarzyszącą wysoką gorączką (>39 st. C) z dreszczami, hipotensją oraz zaimplantowanym cewnikiem centralnym ryzyko rozwoju sepsy jest najwyższe. Postępowanie diagnostyczne u pacjentów z gorączką neutropeniczną musi przebiegać równoległe z postępowaniem leczniczym obejmującym szerokospektralną antybiotykoterapię oraz leczenie wspomagające (takim jak płynoterapia, stosowanie czynników wzrostowych). W diagnostyce konieczne jest zabezpieczenie materiału do badań mikrobiologicznych (np. posiew krwi, posiew moczu, posiew kału) oraz ocena powszechnie stosowanych markerów infekcji takich jak białko C-reaktywne (CRP, *ang. C-reactive protein*) i prokalcytoniny (PCT). CRP ma ograniczoną wartość w ocenie przyczyn gorączki z uwagi na niską specyficzność. PCT natomiast charakteryzuje wysoka specyficzność w odniesieniu do infekcji bakteryjnych, mimo że jest również podwyższona w innych stanach chorobowych. Nie ma zatem idealnego badania pomocniczego pozwalającego jednoznacznie przewidzieć, który pacjent będzie miał tylko FUO, a u którego rozwija się ciężkie zakażenie (potwierdzone klinicznie i/lub mikrobiologicznie) mikrobiologicznie lub sepsa.

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska lek. Małgorzaty Nowak bardzo dobrze wpisuje się w nurt tych zagadnień. Temat rozprawy „*Analiza związku stężeń chemokin receptora CXCR3 z przebiegiem klinicznym gorączki neutropenicznej u dzieci*” odpowiada pod względem merytorycznym jej treści. Jest to oryginalne opracowanie, dotyczące populacji pacjentów pediatrycznych, dla których danych literaturowych jest znacznie mniej niż dla populacji osób dorosłych.

Zasadnicze cele rozprawy, o którym częściowo informuje tytuł obejmowały: ocenę stężenia chemokin receptora CXCR3 w przebiegu zakażeń u dzieci leczonych z powodu chorób nowotworowych, a także ocenę przydatności stężenia chemokin receptora CXCR3 jako wczesnych markerów zakażenia w okresie neutropenii u tych pacjentów. Pozostałe cele badawcze stanowiły analizę czynników epidemiologicznych i przebieg zakażeń u pacjentów onkologicznych w okresie neutropenii, ocenę przydatności markerów infekcji w przebiegu zakażeń u pacjentów onkologicznych.

Podjęte przez Doktorantkę zagadnienie badawcze uważam za oryginalne, aktualne i ważne z praktycznego punktu widzenia.





### Ocena uzyskanych rezultatów i ich znaczenie dla nauki i praktyki

Wnioski z przeprowadzonych badań wyciągnięto w oparciu o analizę 100 epizodów gorączki neutropenicznej u 62 pacjentów pediatrycznych, którzy byli poddani intensywnemu leczeniu przeciwnowotworowemu w Klinice Pediatrii, Onkologii i Hematologii Dziecięcej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi. Są one opisane na 39 stronach, udokumentowane 6 tabelami i 23 rycinami.

W badanej grupie dzieci leczonych z przyczyn onkologicznych najliczniejszą grupę stanowiły dzieci z nowotworami układu krwiotwórczego/chłonnego (białaczki i chłoniaki).

Wyniki przeprowadzonych przez Doktorantkę analiz wykazały, że ponad 66% pacjentów (większość) miało 1 epizod gorączki neutropenicznej, ponad 22,5% pacjentów – 2 epizody, a 3 i więcej epizodów gorączki neutropenicznej występowały u zdecydowanie mniejszego odsetka pacjentów. W ponad 30% epizodów gorączki nie znaleziono przyczyny klinicznej lub mikrobiologicznej zakażenia. W zlokalizowanych infekcjach najczęściej stwierdzanym zakażeniem było zakażenie przewodu pokarmowego. Natomiast w uogólnionych infekcjach najczęściej występowała bakteriemia.

Na podstawie badania przedmiotowego, badań laboratoryjnych oraz mikrobiologicznych Doktorantka dokonała analizy epizodów infekcyjnych, stwierdzając porównywalną ilość epizodów: gorączki neutropenicznej o nieznannej przyczynie (34%), zakażeń udokumentowanych mikrobiologicznie (34%) i zakażeń udokumentowanych klinicznie (z ujemnymi wynikami posiewów bakteriologicznych, 32%). Wśród zakażeń ogólnoustrojowych udokumentowanych mikrobiologicznie dodatni posiew krwi uzyskano w 13% epizodów, najczęściej bakteriami Gram-dodatnimi, rzadziej Gram-ujemnymi (5%). Wśród zakażeń bakteriami Gram-dodatnimi czynnikami etiologicznymi były gronkowce, a w grupie zakażeń krwi o etiologii bakteriami Gram-ujemnymi bakterie z rodziny *Enterobacteriaceae*. Dwa z epizodów posocznicy wymagały hospitalizacji na oddziale intensywnej terapii.

Czynnikiem etiologicznym wszystkich zakażeń przewodu pokarmowego w badanej grupie był bakterie Gram-ujemne, (najczęściej *Escherichia coli*, szczepy ESβL); tak jak zakażeń układu moczowego (najczęściej *Escherichia coli*, szczepy ESβL (+) i *Enterobacter cloacae* szczepy ESβL (+)).

Doktorantka stwierdziła, że wśród zakażeń rozpoznanych na podstawie objawów klinicznych, najczęstszą przyczyną były zakażenia przewodu pokarmowego, podczas gdy pozostałe zakażenia takie jak zapalenia płuc, zakażenia tkanek miękkich, posocznice oraz niewydolność wielonarządowa występowały zdecydowanie rzadziej. Pacjenci z posocznicą oraz niewydolnością wielonarządową wymagali hospitalizacji w intensywnej terapii.

Aby osiągnąć wyznaczone cele badawcze Doktorantka ostatecznie podzieliła epizody infekcyjne wg zaplanowanego, przedstawionego we wcześniejszej części rozprawy, schematu badania. Do grupy FUO zakwalifikowała 34 epizody gorączki o nieznannej przyczynie, natomiast z

grupy zakażeń rozpoznanych klinicznie (CDI, *ang. clinically documented infection*) lub mikrobiologicznie (MDI, *ang. microbiologically documented infection*), obejmującej łącznie 66 epizodów, wyodrębniła grupę najcięższych zakażeń obejmujących zakażenia krwi (BSI, *ang. bloodstream infection*) oraz hospitalizacje w oddziale intensywnej terapii (ICU, *ang. intensive care unit*) z powodu infekcji. Tym samym, do grupy CDI/MDI Doktorantka zaliczyła łącznie 47 epizodów. Grupa BSI/ICU, obejmująca stany najcięższe, liczyła 19 epizodów. Doktorantka stwierdziła, że w grupie FUO częściej rozpoznano u pacjentów z guzami mózgu i guzami litymi, w porównaniu do grupy CDI/MDI oraz BSI/ICU, w których przeważali pacjenci białaczkami.

W dalszej części pracy Doktorantka dokonała korelacji pomiędzy wszystkimi oznaczanymi markerami biochemicznymi w obu punktach czasowych (tzn. w pierwszym punkcie czasowym czyli przy pierwszej gorączce oraz w drugim punkcie czasowym, tzn. 12-24 godziny po pierwszym epizodzie gorączki). Zastosowane przez Doktorantkę skróty dla pierwszego punktu czasowego (skrót nazwy markera-1) i drugiego punktu czasowego (skrót nazwy markera-2), znacząco ułatwiają analizę porównawczą. Analiza korelacji pomiędzy stężeniami poszczególnych markerów wykazała dodatnią korelację stężenia CRP-1 ze stężeniem CRP-2 oraz PCT-1 ze stężeniem PCT-2. Wśród wszystkich badanych chemokin receptora CXCR3 (I-TAC, IP-10, MIG-1) stwierdzono dodatnią korelację pomiędzy stężeniem przy pierwszej gorączce a stężeniem po 12-24 godzinach.

Doktorantka dokonała porównania stężeń badanych markerów infekcji w punkcie czasowym 1., stwierdzając statystycznie istotne różnice stężeń CRP i PCT w poszczególnych grupach epizodów infekcyjnych oraz w grupie kontrolnej, nie stwierdziła jednak istotnych statystycznie różnic w stężeniach MIG w badanych grupach. Natomiast wartości IP-10 oraz I-TAC były bliskie istotności statystycznej. Doktorantka stwierdziła również znamienne wyższe stężenie CRP w grupie CDI/MDI oraz BSI/ICU w porównaniu do grupy kontrolnej, nie obserwowała natomiast znamiennej różnicy stężeń CRP między grupą FUO w stosunku do grupy kontrolnej. Natomiast stężenia CRP nie różniły się pomiędzy grupami epizodów infekcyjnych. W odniesieniu do PCT, Doktorantka obserwowała znamienne wyższe stężenie PCT w grupie BSI/ICU w porównaniu do grup CDI/MDI, FUO oraz grupy kontrolnej. W odniesieniu do MIG stężenia tej hemokiny nie różniły się w poszczególnych grupach epizodów infekcyjnych oraz grupie kontrolnej. Natomiast stężenie chemokiny IP-10 w punkcie czasowym 1. było bliskie istotności statystycznej, wobec czego przeprowadzono analizę *post-hoc*, stwierdzając istotnie niższe stężenie IP-10 w grupie kontrolnej w porównaniu do grupy CDI/MDI. W stosunku do chemokiny I-TAC również wykonano analizę *post-hoc* stwierdzając istotnie niższe stężenie I-TAC w grupie kontrolnej w porównaniu do grupy CDI/MDI.

W dalszej części rozprawy Doktorantka przeprowadziła analizę stężeń markerów infekcji w punkcie czasowym 2. w poszczególnych grupach epizodów infekcyjnych. Stwierdziła istotnie wyższe stężenie PCT w grupie BSI/ICU w porównaniu do grupy CDI/MDI. Odnośnie stężeń IP-10 w





poszczególnych grupach, Doktorantka wykonała analizę *post-hoc*, która wykazała różnice pomiędzy grupą FUO a grupą CDI/MDI. Natomiast nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w stężeniach CRP, MIG oraz I-TAC w badanych grupach epizodów infekcyjnych.

W kolejnej części pracy Doktorantka dokonała porównania stężeń markerów infekcji (CRP, PCT, MIG, IP-10, I-TAC) pomiędzy grupą CDI/MDI+BSI/ICU oraz grupą FUO, stwierdzając istotnie wyższe stężenie IP-10-1, I-TAC-1, IP-10-2, w grupie CDI/MDI+BSI/ICU w porównaniu do grupy FUO. Nie stwierdziła jednak istotnych statystycznie różnic pomiędzy grupami dla pozostałych parametrów w odpowiednich punktach czasowych (CRP-1, PCT-1, MIG-1, CRP-2, PCT-2, MIG-2, I-TAC-2).

Doktorantka dokonała również analizy polegającej na znalezieniu wartości progowych różnicujących FUO od pozostałych stanów infekcyjnych, poprzez wyznaczenie najlepszej wartości progowej różnicującej FUO od pozostałych stanów za pomocą krzywej ROC. Za wartość odcięcia przyjęto:

- dla IP-10 w punkcie czasowym 1. stężenie 67,29 pg/ml (czułość- 70,8%, swoistość -57,1%);
- dla I-TAC w punkcie czasowym 1. stężenie 33,4 pg/ml (czułość - 89,2%, swoistość -42,9%);
- dla IP-10 w punkcie czasowym 2. stężenie 129,9 pg/ml (czułość- 58,5%, swoistość - 71,4%).

Kolejne, przeprowadzone przez Doktorantkę analizy porównania stężeń markerów infekcji (CRP, PCT, MIG, IP-10, I-TAC) w badanych grupach epizodów infekcyjnych pomiędzy punktem czasowym 1. a punktem czasowym 2, wykazały istotny wzrost stężeń w czasie:

- CRP w grupie wszystkich infekcji, FUO, CDI/MDI, BSI/ICU, CDI/MDI+BSI/ICU;
- PCT w grupie wszystkich infekcji, FUO, CDI/MDI, BSI/ICU, CDI/MDI+BSI/ICU;
- chemokiny IP-10 w grupie wszystkich infekcji, FUO, CDI/MDI, BSI/ICU, CDI/MDI+BSI/ICU.

Doktorantka podsumowuje wyniki swoich badań w 6 zwięzłych, wynikających z badań wnioskach. Wnioski te uważam za szczególnie wartościowe z praktycznego punktu widzenia.

#### Poprawność formalno-językowa

Rozprawa zachowuje poprawność formalno-językową, stylistyczną i interpunkcyjną niemal w całości. Z obowiązku recenzenta zwrócę uwagę, że w rozprawach naukowych, przy powszechnym stosowaniu polskiej wersji nazewnictwa międzynarodowego powinno używać się określeń:

- kaspofunginę zamiast „caspofunginę” (strona 17),
- mykafunginę zamiast „mykaminę” (strona 17),
- Pneumocystis jiroveci* zamiast *Pneumocistis jiroveci* (strona 29, błąd ortograficzny, utrzymanie konwencji pisania kursywą nazw gatunków użytych w obcym języku).

## 2. Ocena metodologiczna

### **Dobór literatury i umiejętność wykorzystania źródeł**

W dysertacji zacytowano 202 pozycji piśmiennictwa, wszystkie niemal anglojęzyczne. Zdecydowana większość piśmiennictwa została opublikowana w ostatnich latach. Potwierdza to aktualność tematu oraz znajomość prezentowanych zagadnień i świadczy o umiejętnym wykorzystaniu źródeł naukowych. Z obowiązku recenzenta muszę zwrócić uwagę, że w wykazie piśmiennictwa nie zaobserwowałem konsekwencji odnośnie ilości podanych autorów w pracach wieloautorskich. Nie umniejsza to w żaden sposób wartości pracy, a wymaga jedynie niewielkiej korekty podczas przygotowania pracy do publikacji i dostosowania do wymagań redakcyjnych czasopisma.

### **Poprawność formułowania problemów i hipotez (założenia badawcze)**

Cele dysertacji zostały sformułowane prawidłowo i szczegółowo. Obejmowały one:

- analizę czynników epidemiologicznych oraz przebiegu klinicznego zakażeń u pediatrycznych pacjentów onkologicznych w okresie neutropenii,
- ocenę przydatności standardowych markerów infekcji w przebiegu zakażeń u dzieci leczonych z powodu chorób nowotworowych,
- ocenę stężenia chemokin receptora CXCR3 (MIG, IP-10, I-TAC) w przebiegu zakażeń u dzieci leczonych z powodu chorób nowotworowych,
- ocenę przydatności stężeń chemokin receptora CXCR3 (MIG, IP-10, I-TAC) jako wczesnych markerów zakażenia w okresie neutropenii.

Założenia badawcze zrealizowano poprawnie dokumentując je szeroko opisanymi wynikami. Podjęte przez Doktorantkę zagadnienie badawcze jest bez wątpienia oryginalne, aktualne, ważne i praktyczne.

### **Trafność doboru metod i narzędzi badawczych umiejętność ich zastosowania**

Do realizacji celów badawczych Doktorantka posłużyła się prospektywną analizą. Badaniem objęto 62 pacjentów leczonych w Klinice Pediatrii, Onkologii i Hematologii Dziecięcej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, z powodu choroby nowotworowej. Przedmiotem badania były epizody infekcyjne obserwowane podczas intensywnego leczenia onkologicznego. Kwalifikacja epizodu infekcyjnego do badania następowała w przypadku spełnienia dwóch kryteriów: 1) gorączka - definiowana jako pojedynczy pomiar temperatury ciała  $\geq 38,3$  °C, lub temperatura ciała  $\geq 38$  °C przez okres 1 godziny oraz 2) neutropenia - definiowana jako bezwzględna liczba neutrofilów (ANC)  $< 500/\text{mm}^3$  lub ANC  $< 1000/\text{mm}^3$ , gdy przewiduje się spadek do  $< 500/\text{mm}^3$  w ciągu 48 godzin. Do



badania zakwalifikowano 100 epizodów infekcyjnych. Grupę kontrolną stanowiło 46 pacjentów hospitalizowanych w Uniwersyteckim Centrum Pediatrii im. M. Konopnickiej Centralnego Szpitala Klinicznego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi bez klinicznych i laboratoryjnych cech infekcji.

U wszystkich pacjentów w trakcie leczenia onkologicznego, u których wystąpiła gorączka w okresie neutropenii przeprowadzono badanie przedmiotowe oraz wykonywano dodatkowe badania laboratoryjne i mikrobiologiczne takie jak: morfologia krwi, badania mikrobiologiczne w kierunku patogenów bakteryjnych i grzybiczych (posiew krwi pobrany z żyły i/lub cewnika naczyniowego, posiew moczu, posiew kału, wymaz z gardła). Ponadto dokonywano oznaczenia stężeń białka C-reaktywnego, prokalcytoniny oraz badanych chemokin w surowicy krwi w dwóch punktach czasowych:

- a) przy pierwszej gorączce – punkt czasowy 1. (CRP-1, PCT-1, MIG-1, IP-10-1, I-TAC-1),
- b) w 12.-24. godzinie od pierwszej gorączki – punkt czasowy 2. (CRP-2, PCT-2, MIG-2, IP-10-2, I-TAC-2).

Celem oznaczenia badanych chemokin receptora CXCR3 zabezpieczano surowicę krwi, którą przechowywano w temperaturze -70 °C do czasu uzyskania określonej liczby próbek i wykonania pomiarów. Doktorantka szczegółowo przedstawiła metodykę oznaczania CRP, PCT, MIG, IP-10, I-TAC.

Dodatkowo przeprowadzono inne badania diagnostyczne wymagane aktualnym stanem pacjenta (np. RTG, USG).

Przejrzysty algorytm badania oraz podział badanych grup szczegółowo przedstawiono na rycinie oraz opisie tekstowym.

W pracy dokonano analizy statystycznej z zastosowaniem programu komputerowego STATISTICA 13.3. Odpowiednio dobrana, rozbudowana analiza statystyczna umożliwiła poprawną prezentację otrzymanych wyników badania.

Badanie zostało przeprowadzone za zgodą Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym w Łodzi nr RNN/129/17/KE.

#### **Poprawność układu pracy i struktury podziału treści**

Rozprawa doktorska lek. Małgorzaty Nowak jest estetyczną, starannie przygotowaną monografią liczącą 110 stron, obejmującą: spis treści, objaśnienia skrótów, wstęp, cel pracy, materiał, metody, analizę statyczną, wyniki, dyskusję, wnioski, spis rycin i tabel, streszczenie, abstrakt, oraz piśmiennictwo. Układ ten jest typowy dla rozpraw doktorskich. Dysertacja zawiera 6 tabel i 23 ryciny.

We wstępie Doktorantka wprowadza w zagadnienie występowania infekcji w okresie intensywnego leczenia przeciwnowotworowego u dzieci, a zwłaszcza w tematykę gorączki neutropenicznej. Wszystkie zagadnienia są wsparte aktualnym piśmiennictwem i uzasadniają celowość podjęcia projektu badawczego. W szerokiej dyskusji Doktorantka przedstawia wyniki uzyskane przez innych autorów i ustosunkowuje je do wyników uzyskanych w rozprawie. Ten rozdział (dyskusja) zasługuje na uznanie – czyta się go sprawnie mimo wielu użytych skrótów, jego struktura jest przejrzysta. Całość pracy podsumowuje sześć trafnych wniosków.

### 3. Wniosek końcowy

Podsumowując, stwierdzam że rozprawa doktorska lek. Małgorzaty Nowak jest oryginalnym, nowatorskim opracowaniem autorki, mającym znaczenie dla rozwoju wiedzy, nauki oraz praktyki klinicznej.

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska spełnia wszystkie warunki określone w art.13. ust. ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz 595, z późn. zm.) stawianym jako wymóg dla rozpraw doktorskich. Przedstawioną rozprawę doktorską oceniam pozytywnie i wnoszę do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauk Medycznych Uniwersytetu Medycznego w Łodzi o dopuszczenie lek. Małgorzaty Nowak do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie, w związku dużym znaczeniem przeprowadzonych badań, jej perfekcyjnym opracowaniem metodologicznym i statystycznym oraz trafną analizą wyników, wnoszę do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauk Medycznych Uniwersytetu Medycznego w Łodzi o wyróżnienie rozprawy.

dr hab. n. med. i n. o zdr. Krzysztof Czyżewski, prof. UMK

2002908  
dr hab. n. med. i n. o zdr.  
**Krzysztof Czyżewski, prof. UMK**  
lekarz specjalista pediatrii,  
onkologii i hematologii dziecięcej,  
transplantologii klinicznej  
tel. 886 855 517

2023-09-21