



Dr hab. n. farm. Agnieszka Zimmermann

**Wydział Nauk o Zdrowiu z Oddziałem Pielęgniarstwa i Instytutem
Medycyny Morskiej i Tropikalnej
Gdański Uniwersytet Medyczny
Ul. Tuwima 15, 80-210 Gdańsk**

Gdańsk, 6 lutego 2019 r.

RECENZJA

**rozprawy doktorskiej mgr Wojciecha Lemskiego
pt. „*Biochemiczna ocena surowiczych markerów obrotu chrzęstnego w przebiegu
młodzieńczego idiopatycznego zapalenia stawów*”
napisanej pod kierunkiem prof. dr hab. Krystyny Olczyk
oraz promotora pomocniczego dr hab. n. med. Katarzyny Winsz-Szczotki**

Ocena wyboru tematu

Młodzieńcze idiopatyczne zapalenie stawów (MIZS) jest chorobą przewlekłą, która może doprowadzić do niepełnosprawności dziecka poprzez zaburzenie funkcji układu kostno-stawowego. Choroba ta może mieć bardzo różny przebieg kliniczny, co potęguje złożoność postępowania diagnostycznego. Charakteryzują ją okresy remisji i zaostrzeń, co stanowi wielkie wyzwanie zarówno na etapie diagnozowania jak i leczenia. Tymczasem w terapii choroby ze względu na jej nieodwracalne następstwa, niezmiernie ważne jest by leczenie zostało wdrożone szybko. Do tego niezbędne jest właściwe i skuteczne postępowanie diagnostyczne. Trudność we właściwym diagnozowaniu MIZS stanowi m. in. wykluczenie obecności innych jednostek chorobowych, przebiegających z zapaleniem struktur stawowych. Dotychczas otrzymywane wyniki laboratoryjnych badań diagnostycznych nie stanowią jednoznacznego potwierdzenia rozpoznania choroby czy też jej wykluczenia. Niezwykle potrzebne są zatem próby znalezienia wczesnych biomarkerów, określających stopień nasilenia i/lub postępu uszkodzenia chrząstki stawowej u dzieci z MIZS. Takimi biomarkerami mogą być fragmenty kolagenu typu II, które są uwalniane do płynów biologicznych w przebiegu metabolicznych przemian tego białka.

Doktorant słusznie podjął trud badawczy dokonania oceny surowiczego stężenia zarówno C-końcowego propeptydu łańcucha α kolagenu typu II (PIICP) – odzwierciedlającego wielkość biosyntezy chrząstki stawowej jak i C-końcowego telopeptydu łańcucha α kolagenu typu II (CTXII) – jako biomarkera resorpcji wymienionej tkanki, u dzieci z MIZS – zarówno przed leczeniem jak i po uzyskaniu u nich klinicznej poprawy.

Tematyka poruszana przez Doktoranta jest istotna i aktualna a uzyskane w pracy wyniki poza ich charakterem poznawczym mogą mieć znaczenie aplikacyjne.

Ocena formalno – redakcyjna

Recenzowana rozprawa ma typowy dla dysertacji doktorskiej układ. Zawarta jest na 130 stronach. Struktura pracy jest przejrzysta i logiczna, została zachowana właściwa proporcja poszczególnych części, które są koherentne i zgodne z ich tytułami. Treść pracy odpowiada jej tytułowi. Pierwszą część monografii stanowi wprowadzenie w problematykę, opisujące epidemiologię, patogenezę oraz diagnostykę i zasady leczenia MIZS. We wstępie zawarto także charakterystykę budowy i funkcji chrząstki stawowej, opis kolagenów i zarys problematyki biomarkerów pozwalających na wykrycie choroby. Następną część pracy stanowi materiał empiryczny, obejmujący założenia pracy, opis wykorzystanych metod badawczych, uzyskane podczas badań wyniki, dyskusję i wnioski. Praca zawiera również wykaz wykorzystanego piśmiennictwa oraz spis tabel i rycin. Piśmiennictwo obejmuje 170 pozycji, pochodzących z uznanych źródeł naukowych, głównie z przedziału ostatnich 10 lat. Są one dobrane w sposób przemyślany i rzeczowy. W większości Autor powołuje się na pozycje anglojęzyczne. Rozprawę dopełniają streszczenie w języku polskim i angielskim. Edytorsko praca jest bardzo staranna, poprawna stylistycznie, czytelna, ilustrowana 27 rycinami i 19 tabelami.

Ocena merytoryczna

Cześć teoretyczna rozprawy napisana jest rzeczowo, z należytą starannością i poświadcza odpowiednie znanstwo zagadnień podjętej problematyki. Przedstawione treści łączą się z celem pracy.

Konceptualizacja badań własnych i opis procedury badawczej jest klarowny i nie pozostawia wątpliwości. Właściwe zaplanowanie zadań pozwoliło na owocne ich zakończenie.

Materiałem biologicznym, wykorzystanym do badań była krew pobrana z żyły zgięcia łokciowego od 30 dzieci obojga płci, w tym – 19 dziewczynek i 11 chłopców, w wieku od 2-go do 12-go roku życia, ze świeżo rozpoznanym młodzieńczym idiopatycznym zapaleniem stawów, leczonych w Poradni Reumatologicznej Samodzielnego Publicznego Zakładu Opieki Zdrowotnej Centrum Pediatrii im. Jana Pawła II w Sosnowcu lub hospitalizowanych na Oddziale Reumatologii. Materiał referencyjny do badań stanowiły próbki krwi żyłnej pozyskane od 30 zdrowych dzieci, w tym 17 dziewczynek i 13 chłopców, w odpowiednio – w stosunku do pacjentów z MIZS – dobranych grupach wiekowych, tj. przed okresem pokwitania, ocenionym zgodnie z skalą Tannera i Marshalla. Do badań wykorzystano krew pozyskaną od dzieci, u których wykonywano zaplanowane badania profilaktyczne. Do badań zostały zakwalifikowane dzieci, które w ostatnim roku nie przebyły chorób wymagających hospitalizacji, u których nie wykonywano zabiegów chirurgicznych, które w czasie poprzedzającym badania nie były leczone farmakologicznie, a ponadto wyniki rutynowych oznaczeń hematologicznych oraz biochemicznych we krwi nie odbiegały od wartości przyjętych za prawidłowe dla tej grupy wiekowej. Stwierdzam, że Doktorant zadbał o właściwy dobór próby badanej i grupy kontrolnej.

Przed pozyskaniem materiału biologicznego, prawni opiekunowie zarówno dzieci zdrowych jak i chorych na młodzieńcze idiopatyczne zapalenie stawów wyrazili zgodę na udostępnienie i wykorzystanie pobranego materiału biologicznego, pozostającego po wykonaniu zleconych badań diagnostycznych. Każdego uczestnika badania oraz jego opiekuna prawnego poinformowano o rodzaju i celu wykonania dodatkowych badań biochemicznych. Na przeprowadzenie niniejszych badań wyraziła zgodę Komisja Bioetyczna Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach. Doktorant zadbał o stronę formalno-prawną zaprojektowanego przedsięwzięcia badawczego.

W celu dokładnego określenia nasilenia zmian patologicznych w stawach w grupie dzieci chorych użyto metod diagnostyki obrazowej, tj. RTG oraz USG. Aktywność procesu zapalnego u dzieci chorych oceniono natomiast z użyciem laboratoryjnych wskaźników procesu zapalnego, tj. CRP i ESR. Ponadto, trafność diagnozy potwierdzano oceną występowania we krwi czynnika RF oraz wartościami miana przeciwciał przeciwjądrowych (ANA) oraz przeciwciał przeciw cyklicznemu cytrulinowanemu peptydowi (anty-CCP). Dzieci zakwalifikowane do badań zostały – w zależności od rozpoznanego typu schorzenia – podzielone na grupy, tj. pacjentów z nielicznostawową, oraz wielostawową postacią MIZS. Aktywność choroby u dzieci oceniono na podstawie wartości zmiennych, uwzględniających zarówno całkowitą ocenę aktywności choroby, dokonaną przez lekarza i mierzoną na

wizualnej skali analogowej (VAS, gdzie 0=stan nieaktywny, 10= maksymalna aktywność), ocenę samopoczucia wskazaną przez dziecko lub jego opiekuna (skala VAS), liczbę stawów ze stwierdzonym aktywnym procesem zapalnym (obrzękiem lub ograniczoną ruchomością i wzmożonym uciepleniem, bólem lub tkliwością), jak również – wartości stężenia laboratoryjnych wskaźników ostrej fazy (CRP, ESR). Uzyskane wyniki stanowiły podstawę do zakwalifikowania pacjentów do grupy z umiarkowaną aktywnością choroby, w terapii których zastosowano sulfasalazynę (SSA) oraz prednison, lub do grupy chorych z dużą aktywnością MIZS, u których – do wspomnianego leczenia – dołączono metotreksat (MTX). W terapii dzieci z artropatią stosowano SSA (Sulfasalazin EN) w dawce 30 mg, przeliczonej na kilogram masy ciała, prednison (Encorton) w maksymalnej dawce 1 mg, przeliczonej na kilogram masy ciała, codziennie, ze stopniową redukcją dawki oraz MTX (Methotrexat) w dawce ≤ 15 mg, przeliczonej na metr kwadratowy powierzchni ciała, w jednej dawce na tydzień.

Podstawą wykluczenia z badania było przebycie urazów, zabiegów operacyjnych układu ruchu, przebytych w ostatnich 3 latach, współistnienie chorób autoimmunologicznych i metabolicznych, w tym z cukrzycy, chorób nowotworowych, chorób nerek, wątroby oraz przewlekłych zakażeń. Wykluczono także pacjentów z chorobą psychiczną lub innymi schorzeniami, utrudniającymi współpracę lekarza z pacjentem.

U wszystkich chorych, zakwalifikowanych do badań ilościowa ocena markerów obrotu chrzęstnego w surowicy krwi przeprowadzona została przed rozpoczęciem leczenia modyfikującego przebieg choroby, a także – u tych samych chorych po uzyskaniu u nich stanu klinicznej poprawy, tj. po co najmniej jedenastomiesięcznym okresie leczenia, średnio po 11.60 ± 0.21 miesiąca od rozpoczęcia terapii. Stosowane kryteria poprawy klinicznej były zgodne z wytycznymi ACR Pediatric 30, w myśl których za poprawę stanu klinicznego u pacjenta z MIZS można przyjąć stwierdzenie przynajmniej 30% polepszenia w trzech z następujących sześciu parametrów, takich jak: liczba stawów z czynnym zapaleniem, liczba stawów z ograniczeniem ruchomości, stopień aktywności choroby oceniony przez lekarza (skala VAS), ogólne samopoczucie ocenione przez dziecko lub rodzica (skala VAS), wartość laboratoryjnego wskaźnika ostrej fazy (CRP lub ESR), dane wynikające z kwestionariusza oceny stanu funkcjonalnego Childhood Health Assessment Questionnaire (CHAQ).

Badania przeprowadzone w surowicy dzieci zdrowych oraz chorych na MIZS objęły:
- oznaczenie surowiczego stężenia C-końcowego propeptydu łańcucha α kolagenu typu II (PIICP), wykonane metodą immunoenzymatyczną ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), testem ELISA Kit for Procollagen II C-Terminal Propeptide. Wykonano je w grupie

dzieci zdrowych, dzieci z świeżo rozpoznanym MIZS oraz w grupie tych samych pacjentów po zastosowaniu leczenia i uzyskaniu klinicznej poprawy;

- oznaczenie stężenia C-końcowego telopeptydu łańcucha α kolagenu typu II (CTXII) w surowicy krwi badanych wszystkich grup, tj. w grupie dzieci zdrowych (grupa kontrolna), w grupie dzieci ze świeżo rozpoznanym, nie leczonym MIZS oraz w grupie tych samych dzieci chorych po uzyskanej u nich, w wyniku leczenia, klinicznej poprawy. Oznaczenie wykonane zostało metodą immunoenzymatyczną ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), testem ELISA Kit for Cross Linked C-Telopeptide of Type II Collagen;

- oznaczenie stężenia czynnika martwicy nowotworu α (TNF- α) w surowicy krwi osób wszystkich badanych grup, tj. w grupie dzieci zdrowych (grupa kontrolna), w grupie dzieci ze świeżo rozpoznanym, nie leczonym MIZS oraz w grupie tych samych dzieci chorych po uzyskanej u nich, w wyniku leczenia, klinicznej poprawy. Oznaczenie wykonane zostało metodą immunoenzymatyczną ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), testem Human TNF- α ELISA Kit.

Dobór materiału badawczego i narzędzi badawczych potwierdza dojrzałość naukową Doktoranta i zaświadcza o znakomitej organizacji pracy.

Otrzymane wyniki poddano opracowaniu statystycznemu. Zostały one przedstawione czytelnie za pomocą tabel oraz wykresów.

W prowadzonej umiejętnie dyskusji Doktorant krytycznie omówił wyniki badań własnych w odniesieniu do danych z piśmiennictwa. Dyskusja napisana jest w sposób interesujący, świadczy o znajomości zagadnienia i dużej rzetelności naukowej Doktoranta.

Doktorant po przeprowadzeniu szczegółowej analizy wysnuł racjonalne wnioski:

1. W przebiegu młodzieńczego idiopatycznego zapalenia stawów dochodzi do zaburzeń metabolizmu tkanki chrzęstnej, znajdujących odzwierciedlenie w ilościowych zmianach C-końcowego propeptydu łańcucha α kolagenu typu II jak i C-końcowego telopeptydu łańcucha α kolagenu typu II, wykazanych w surowicy dzieci chorych.
2. Zmiany stężeń PIICP oraz CTXII w surowicy pacjentów z młodzieńczym idiopatycznym zapaleniem stawów, stanowiąc wyraz zaburzeń metabolicznych, współuczestniczących w patogenezie artropatii, zależą zarówno od płci dzieci badanych, postaci schorzenia, oraz przebiegu choroby, który decyduje o podjętym protokole leczenia.
3. Procesy przemian kolagenu typu II u dzieci z MIZS, w szczególności procesy jego syntezy, pozostają w związku z ustrojową ekspresją czynnika martwicy nowotworu α .
4. Zastosowana farmakoterapia, doprowadzająca do uzyskania u chorych poprawy klinicznej, równocześnie przyczynia się do zahamowania – stymulowanych procesem

immunologiczno-zapalnym – niszczenia struktur chrzęstnych, i jednocześnie wydaje się sprzyjać procesom regeneracyjnym.

Uwagi i sugestie

Podczas recenzji przedstawionej dysertacji nasunęły się następujące uwagi i sugestie:

1. w kilku miejscach praca wymaga dopracowania edytorskiego, np. brakuje właściwego wyodrębniania akapitów, brakuje odpowiednich odstępów (spacji), pozostawiono podwójne kropki na końcu zdania;
2. w pracy brakuje odnośnika do pozycji 63 piśmiennictwa, w złej kolejności zacytowano pozycje: 121, 133, 139, 157; na str. 99 błędnie zapisano kolejność pozycji piśmiennictwa „[138,137]”;
3. zastosowano niejednolity sposób cytowania książek, np. poz. 17, 13, 36;
4. na str. 31 zapisano, że lek biopodobny (bp-infliksymab) został „dopuszczony do stosowania przez Europejską Agencję Leków” podczas gdy wniosek o dopuszczenie do obrotu jest rozpatrywany przez EMA ale decyzję w tej sprawie wydaje Komisja Europejska na podstawie opinii naukowej Komitetu ds. Produktów Leczniczych Stosowanych u Ludzi (CHMP). Dopuszczaniem do obrotu i rejestracją leków w procedurze centralnej zajmuje się Komisja Europejska. Prawidłowe jest także określenie „dopuszczenie do obrotu” a nie „dopuszczenie do stosowania”.

Podsumowanie

Przedstawiona do recenzji praca stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego. Wymienione w recenzji uwagi nie dotyczą merytorycznej wartości pracy, mają jedynie charakter drobnych wskazówek, które mogą okazać się przydatne w przyszłym przygotowaniu monografii do publikacji. Przedstawiona rozprawa doktorska Pana Wojciecha Lemskiego wskazuje, że Doktorant jest dobrze przygotowany do podejmowania badań i wyzwań naukowych. Nowatorski charakter badań, kompetencje Doktoranta, umiejętność planowania pracy badawczej i formułowania wniosków oraz znaczenie uzyskanych wyników dla rozwoju nauki i praktyki zaświadcza o dojrzałości naukowej.

Praca spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim, w pełni odpowiada warunkom określonym w art. 13 ustawy z dnia 14 marca 2003 o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki. W związku z powyższym

wnoszę do Wysokiej Rady Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej w Sosnowcu Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach o dopuszczenie Pana mgr Wojciecha Lemskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Kierownik
Zakładu Prawa Medycznego i Farmaceutycznego



dr hab. Agnieszka Zimmermann