UNIWERSYTET MEDYCZNY W LUBLINIE

Klinika Chorób Płuc i Reumatologii Dziecięcej, II Katedra Pediatrii

20-093 Lublin, ul. Prof. A. Gębali 6
tel. 81 71 85 477, tel/fax 81 74 30 141

Lublin, dnia 14.06.2022 r.

Dr hab. n. med. Violetta Opoka-Winiarska
Klinika Chorób Płuc i Reumatologii Dziecięcej
II Katedra Pediatrii
Uniwersytet Medyczny w Lublinie
ul. Prof. A. Gębali 6, 20-093 Lublin
e-mail: violetta.opoka-winiarska@umlub.pl

RECENZJA ROZPRAWY NA STOPIEŃ DOKTORA NAUK MEDYCZNYCH

mgr Magdaleny Sienkiewicz

pt. OCENA PROFILU IZOFORM TRANSFERYNY W MŁODZIEŃCZYM IDIOPATYCZNYM ZAPALENIU STAWÓW

Promotor: dr hab. n. med. Bogdan Cylwik

Młodzieńcze idiopatyczne zapalenie stawów (MIZS) jest najczęściej występująca zapalną chorobą reumatyczną w wieku rozwojowym. Pomimo istotnego postępu dotyczącego wiedzy o patogenezie choroby i poprawy skuteczności terapii, stosowane do rozpoznania i oceny aktywności choroby markery nie są wystarczająco czułe i specyficzne.

Transferyna jest wielofunkcyjną glikoproteiną, w tym negatywnym białkiem ostrej fazy. Nieprawidłowa glikozylacja transferyny występuje we wrodzonych zaburzeniach metabolicznych, ale także jako wynik wtórnych zaburzeń glikozylacji. Niezależnie od przyczyny zmiany w glikozylacji transferyny są oceniane na podstawie profilu jej izoform. Zmiany we względnych proporcjach izoform transferyny zostały opisane w kilku chorobach przewlekłych, w tym w reumatoidalnym zapaleniu stawów (RZS), natomiast niewiele dotychczas wiadomo o ich profilu w MIZS.

Przedstawiona do recenzji praca na stopień doktora nauk medycznych mgr Magdaleny Sienkiewicz podejmuje próbę ustalenia profilu izoform transferyny u chorych na MIZS i określenia jego przydatności jako markera w diagnostyce tej choroby.

Rozprawa doktorska składa się ze 171 stron wydruku komputerowego w typowym układzie: wykaz skrótów, wstęp, cel pracy, materiał i metody, wyniki, dyskusja, wnioski, streszczenie w języku polskim i angielskim, piśmiennictwo oraz wykaz tabel i rycin i wykresów. Piśmiennictwo obejmuje 167 pozycji podanych w kolejności alfabetycznej. Praca zawiera 12 rycin i 41 tabel. Rozprawa jest prawidłowo zredagowana.

Na przeprowadzenie badania uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku - zgody KB R-I-002/72/2016 i KB R-I-002/78/2018, kopię zgody umieszczono jako załącznik do rozprawy (strona 172).

Wstęp pracy zajmuje 56 stron i bardzo szeroko omawia jednostkę chorobową, będącą przedmiotem badań, kolejno: podział chorób reumatycznych u dzieci, definicję, klasyfikację, epidemiologię, etiopatogenezę, objawy kliniczne, diagnostykę laboratoryjną, obrazową i patomorfologiczną oraz różnicową, następnie ocenę aktywności choroby. Najbardziej interesująca i ważna w mojej opinii jest ostatnia część wstępu opisująca m.in. informacje na temat budowy i funkcji transferyny, opis procesu glikozylacji białek oraz profil izoform transferyny i zaburzenia glikozylacji białek w innych chorobach reumatycznych. Wstęp w sposób wyczerpujący przedstawia aktualną wiedzę powiązaną z tematem rozprawy, co jest istotne dla zrozumienia przedmiotu badań. Należy podkreślić też wkład pracy włożony w całościowe opisanie choroby w tym rozdziale.

Cele badania Doktorantka przedstawia w postaci celu głównego oraz 6 celów szczegółowych. Główny cel pracy określony został jako wyznaczenie profilu glikozylacji izoform transferyny w MIZS i określenie jego przydatności w diagnostyce laboratoryjnej tej choroby. Cele szczegółowe dotyczyły oceny stężenia izoform transferyny i całkowitego stężenia transferyny u dzieci chorych na MIZS, porównania profilu izoform transferyny i stężenia transferyny w dwóch postaciach klinicznych choroby: MIZS o początku nielicznostawowym i wielostawowym seronegatywnym, związku stężenia transferyny i jej izoform z aktywnością choroby wg JADAS 27 oraz stanem funkcjonalnym pacjenta, związku stężenia transferyny i jej izoform z innymi badaniami laboratoryjnymi oraz ustalenia mocy diagnostycznej oznaczeń transferyny i jej izoform. Zarówno cel główny jak i cele szczegółowe są zwięzłe i logicznie. Wszystkie cele są w mojej opinii ważne, szczególnie w aspekcie potencjalnego znaczenia praktycznego.

Rozdział zatytułowany „Materiał i metody” przedstawia badaną grupę i metody badania. Grupę badaną stanowiło 77 dzieci w wieku od 1 do 18 lat z rozpoznaniem MIZS, pacjentów Kliniki Pediatrii, Reumatologii, Immunologii i Chorób Metabolicznych Kości Uniwersyteckiego Dziecięcego Szpitala Klinicznego w Białymstoku. W czasie badania czas trwania choroby wynosił od 2 miesięcy do 14 lat, w tym u 47 pacjentów (53,4%) badanie przeprowadzono w czasie rozpoznania choroby. Analizę danych ograniczono do grup pacjentów z postacią nielicznostawową i wielostawową seronegatywną choroby (razem 66 chorych), ze względu na małą liczebność pacjentów z innymi postaciami MIZS.

Grupę kontrolną stanowiło 39 dzieci w wieku od 2 do 18 lat.

Zastosowane metody statystyczne w pracy są odpowiednie do zebranego materiału.

Otrzymane wyniki Doktorantka przedstawiła szczegółowo, starannie wykorzystując dane. W kolejnych podrozdziałach przedstawione zostały: charakterystyka laboratoryjna pacjentów z wyodrębnionych grup z oceną rozkładu wartości badań laboratoryjnych, porównania wyników badań laboratoryjnych między badanymi grupami chorych i grupą kontrolną.

Stężenia transferyny z profilem jej izoform zostały przedstawione i porównanie w badanych grupach, w grupie MIZS dodatkowo oceniono zależność od aktywności choroby (JADAS 27) i jakości życia ocenianej kwestionariuszem CHAQ, a także innych badań laboratoryjnych.

Stwierdzono istotnie niższe stężenie transferyny w całej grupie MIZS oraz w obu badanych podgrupach w porównaniu do grupy kontrolnej bez znamiennych różnic pomiędzy podgrupami. W profilu izoform transferyny wykazano, iż względne stężenie trisjalo-Tf i tetrasjalo-Tf jest istotnie niższe, a pentasjalo-Tf znacząco wyższe we wszystkich grupach badanych w porównaniu do wartości u dzieci z grupy kontrolnej.

Badania nie wykazały zmienności profilu jej izoform w zależności od stopnia aktywności MIZS ocenianej w skali JADAS27. Wartości mediany stężenia transferyny i poszczególnych jej izoform nie wykazały także istotnych różnic pomiędzy podgrupami pacjentów z małą, umiarkowaną i dużą aktywnością choroby. Niemniej wykazano, że stężenie transferyny istotnie ujemnie koreluje z wartością JADAS27 w całej grupie badanej oraz u chorych na wybrane postacie choroby. W przypadku profilu izoform transferyny, trisjalo-Tf istotnie ujemnie a pentasjalo-Tf znacząco dodatnio korelowała z aktywnością choroby w całej grupie chorych na MIZS.

Wykazano także, że transferyna ujemnie koreluje z wartością CHAQ w całej grupie chorych na MIZS, jak i wybranych postaciach, w tym stopniem niepełnosprawności i nasilenia bólu.

Analiza wyników wykazała także ujemną współzależność stężenia transferyny z liczbą zajętych stawów w całej grupie MIZS, natomiast pentasjalo-Tf istotnie dodatnio korelowała z liczbą tych stawów.

Bardzo cenne jest w mojej opinii przedstawienie oceny mocy diagnostycznej transferyny i jej izoform. Wartość diagnostyczna transferyny była oceniana w całej grupie badanej, jak i w obu podgrupach MIZS.

Dyskusja uzyskanych wyników jest wnikliwa i dowodzi wiedzy Doktorantki oraz umiejętność jej wykorzystania. W dyskusji Doktorantka wykazała nowatorskość prowadzonych badań.

W mojej opinii najciekawsza część dyskusji dotyczy omówienia wyników dotyczących stężenia transferyny i profilu jej izoform jako wykładników chorób reumatycznych, w tym MIZS.

Całość dyskusji świadczy o dobrym przygotowaniu i znajomości tematu przez Doktoranta. Doktorantka sprawnie korzystała ze źródeł, prawidłowo dobierając literaturę naukową. Piśmiennictwo zostało odpowiednio dobrane i prawidłowo cytowane, obejmuje 167 pozycje, niemal 80% anglojęzyczne, ponad 60% cytowanych artykułów pochodzi z ostatnich 10 lat.

Wnioski zostały przedstawione w 7 punktach, które odpowiadają na zawarte w celu pracy zadania.

1. W młodzieńczym idiopatycznym zapaleniu stawów dochodzi do zmiany stężenia transferyny i zmian w profilu jej izoform w surowicy krwi.

2. Zmiana stężenia transferyny polega na zmniejszeniu jej poziomu a zmiany w profilu izoform transferyny w MIZS polegają na przesunięciu obrazu w kierunku izoform bogatosjalowanych, ze wzrostem stężenia frakcji pentasjalo- i obniżeniem stężenia trisjalo- i tetrasjalotransferyny. Przesunięcia w obrazie izoform transferyny nie różnicują postaci nieliczno- i wielostawowej seronegatywnej choroby.

3. Zmiany w obrębie profilu izoform transferyny świadczą o aktywnym procesie zapalnym i mogą wskazywać na zaburzenia procesu glikozylacji (sjalilacji) białek w MIZS.

4. Dowodem na aktywny proces zapalny jako przyczyny zmian w profilu izoform transferyny w MIZS jest współzależność stężenia trisjalo- i pentasjalotransferyny ze stężeniem białek ostrej fazy. Trisjalotransferyna może być użytecznym wskaźnikiem zapalenia w postaci nielicznostawowej MIZS.

5. Zmiany stężenia transferyny, trisjalo- i pentasjalotransferyny są związane z aktywnością MIZS, a zmiany stężenia transferyny - z postacią nieliczno- i wielostawową seronegatywną choroby.

6. Profil izoform transferyny, poza transferyną, nie jest powiązany ze stanem funkcjonalnym chorych na MIZS.

7. Bardzo dobra moc diagnostyczna oznaczeń pentasjalotransferyny w postaci wielostawowej seronegatywnej MIZS wskazuje na możliwość wykorzystania tego badania jako markera tej postaci choroby."

Należy podkreślić nowatorski charakter wniosków i ich potencjalne znaczenie dla praktyki klinicznej.

Streszczenie w języku polskim i angielskim jest napisane w sposób typowy dla rozpraw doktorskich.

Moja ogólna ocena pracy doktorskiej jest pozytywna, niemniej mam kilka uwag, w większości redakcyjnych.

W mojej opinii we wstępie podrozdziały takie jak epidemiologia, etiopatogeneza, objawy kliniczne diagnostyka obrazowa, patomorfologiczna, podobnie oraz diagnostyka różnicowa nie są istotnie powiązane z przedstawieniem problemu badawczego i mogły być skrócone lub nawet pominięte. Tym bardziej, że wstęp został mocno oparty na monografii na temat MIZS z 2014 roku - pozycja 134 piśmiennictwa została cytowana we wstępie ponad 90 razy. Natomiast roli transferyny jako negatywnego białka ostrej fazy w chorobach reumatycznych poświęciła Doktorantka we wstępie jedno zdanie. W mojej opinii ten temat wymagałby uzupełnienia. Dodatkowego komentarza wymagają także podane we wstępie zakresy wartości referencyjnych cytowanych za artykułem z 1996 roku [37], zwłaszcza, że badanie prowadzone było u pacjentów w różnych grupach wiekowych.

We wstępie zawarto 4 ryciny i 7 tabel, do których podano cytowania, ale brakuje informacji, czy są to ryciny i tabele przeniesione z artykułów, czy opracowane przez Doktorantkę na ich podstawie.

Poprawy wymaga sposób zastosowania skrótów. Po raz pierwszy zastosowane skróty nie są tłumaczone, np. ANA, RF, MMP, Th, INF, CHAQ, niektóre nie zostały tłumaczone i nie zawarte w spisie skrótów, np. MRP. Natomiast inne skróty, np. postaci MIZS, RZS, JADAS, tłumaczone są wielokrotnie lub zamiennie z pełną nazwą. Doktorantka prawidłowo tłumaczy skrót ANA jako „przeciwciała przeciwjądrowe", ale w pracy używa terminu „przeciwciała

ANA” lub nawet „przeciwciała przeciwjądrowe ANA”, co nie jest nie jest poprawne. Analogicznie niepoprawne są „czynnik RF” lub „czynnik reumatoidalny RF”.

W opisie celu pracy powtórzono informacje zawarte we wstępie, które mogły zostać pominięte.

W rozdziale dotyczącym materiału i metod badane grupy pacjentów zostały dokładnie opisane, niemniej zabrakło precyzyjnego określenia kryteriów włączenia i wyłączenia dla grupy badanej i kontrolnej.

Tabela 9 jest powtórzoną tabelą 1 i mogła zostać pomięta.

Materiałem badanym była krew żylna. Proponowałabym uzupełnienie informacji o ilość pobranej krwi oraz czy krew była pobierana przy standardowych badaniach kontrolnych, czy dodatkowo, specjalnie do badań. Informacje te są ważne, szczególnie przy badaniach prowadzonych u dzieci i młodzieży. Wskazane byłoby określenie lat prowadzenia badania.

W rozdziale o metodach powtórzono wartości referencyjne dla stężenia transferyny z wymienionego już źródła z 1996 roku, bez zaznaczenia jakiej grupy wiekowej dotyczą (37). Podobnie dodatkowego komentarza dotyczącego wieku badanych wymagają inne wartości referencyjne, poza morfologią krwi i kreatyniną.

Podsumowanie Doktorantki „Transferyna posiada dostateczną moc diagnostyczną jako test do wykrywania chorych na MIZS, OA i PA RF(-)” wymaga w mojej opinii dodatkowego komentarza. Analiza współzależności stężenia transferyny ze stężeniem białek ostrej fazy wykazała istotnie ujemną korelację z CRP, haptoglobiną, alfa 1-kwaśną glikoproteiną (AGP), alfa 1-antytrypsyną (AAT). Zatem należy odpowiedzieć na pytanie, czy transferryna ma moc wykrywania wymienionych jednostek chorobowych, czy stanu zapalnego, będącego podstawowym procesem patologicznym w tych jednostkach?

Cennym elementem, której nie uwzględniono w pracy byłaby analiza badanych parametrów u chorych z nowo rozpoznanym MIZS, przed włączeniem leczenia. W pracy nie uwzględniono tej analizy, chociaż w dyskusji zawarto informację, że „ charakterystyczny obraz profilu izoform transferyny w MIZS można wykorzystać do celów diagnostycznych już we wczesnej fazie choroby (..)”. Podobnie nie znalazłam w pracy analizy stężenia transferyny i jej izoform w zależności od wieku, chociaż w dyskusji Doktorantka pisze „Zatem, można wysunąć wniosek, iż profil izoform transferyny może przybierać różne charakterystyczne obrazy w zależności od wieku (…)”. Przy przygotowaniu publikacji proponuję rozszerzyć analizę.

W dyskusji powtórzenie definicji MIZS, objawów i kolejny raz wymienienie postaci choroby oraz zasad rozpoznawania nie ma w mojej opinii uzasadnienia. Podobnie liczne powtórzenia dotyczące informacji o glikoproteinach, w tym transferynie, ponowne omówienie celu pracy, materiał i metod.

Przy publikacji proponuję pominąć cytowanie rozdziałów podręczników i rozważyć potrzebę cytowanie starszych artykułów.

Powyższe moje uwagi do rozprawy, w większości redakcyjne, w niczym nie umniejszają wartości pracy i wynikają z obowiązku recenzenta.

Podsumowując, przedstawioną do recenzji rozprawę doktorską mgr Magdaleny Sienkiewicz oceniam pozytywnie. Praca w mojej opinii stanowi ważny wkład w wiedzę na temat znaczenia transferyny i profilu jej izoform jako potencjalnych markerów MIZS. Doktorantka wykazała się szeroką wiedzą teoretyczną w podjętym temacie i umiejętnością samodzielnego prowadzenia pracy naukowej.

Podjęty temat jest ważny i nowatorski, a rozprawa doktorska stanowi oryginalne rozwiązanie podjętego problemu naukowego. Ma potencjalne wartości praktyczne. Cele prac zostały sformułowane poprawnie, metody i narzędzia badawcze prawidłowo dobrane i zastosowane. Analiza wyników oraz dyskusja zostały przeprowadzona prawidłowo oraz posumowane logicznymi wnioskami.

Zatem przedstawiona rozprawa mgr Magdaleny Sienkiewicz w mojej ocenie spełnia wymogi stawiane rozprawie na stopień naukowy doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu, w dyscyplinie nauki medyczne, określone art. 187.1. ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce. Wnioskuję zatem do Rady Kolegium Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku o dopuszczenie mgr Magdaleny Sienkiewicz do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Violetta Opoka-Winiarska