

Dr hab.n.med. Sabina Więcek
Klinika Pediatrii, Katedry Pediatrii
Wydział Nauk Medycznych w Katowicach
Śląski Uniwersytet Medyczny

Katowice 18.08.2022



RPW/16325/2022
Data: 2022-08-22
UMB

**DZIEKAN WYDZIAŁU LEKARSKIEGO
Z ODDZIAŁEM STOMATOLOGII I ODDZIAŁEM NAUCZANIA W JĘZYKU
ANGIELSKIM**

**UNIWERSYTET MEDYCZNY
W BIAŁYMSTOKU**

Ocena rozprawy doktorskiej lek. Aleksandry Czajkowskiej pt. „Nowe nieinwazyjne markery nieswoistych chorób zapalnych jelit u dzieci.”

Rozprawa doktorska lek. Aleksandry Czajkowskiej dotyczy bardzo istotnego tematu jakim jest poszukiwanie nowych małoinwazyjnych markerów nieswoistych chorób zapalnych jelit (IBD). Aktualnie obserwuje się wzrastającą częstość występowania nieswoistych chorób zapalnych jelit w populacji pediatrycznej, w coraz młodszych grupach wiekowych, również w okresie niemowlęcym. Nieswoiste choroby zapalne jelit mają charakter nawrotowy, przebiegają z nieprzewidywalnymi okresami zaostrzeń oraz remisji. Etiologia IBD nie jest wyjaśniona. Uwzględnia się czynniki genetyczne (gen NOD2, CARD15, IRGM), immunologiczne (aktywacja limfocytów Th2 lub Th1, podwyższone stężenia interleukin, wysokie stężenie TNF alfa) oraz środowiskowe (dieta, otyłość). Niewątpliwą rolę odgrywa zmiana mikrobioty. Brak jednoznacznego czynnika przyczynowego tych schorzeń, uniemożliwia włączenie leczenia przyczynowego. Choroby te charakteryzuje różnorodny obraz kliniczny, lokalizacja oraz rozległość stanu zapalnego. Pierwszym objawem może być manifestacja pozajelitowa. W początkowym okresie choroby objawy są bardzo niecharakterystyczne, wyniki badań laboratoryjnych i obrazowych niejednoznaczne. Prawidłowe postawienie rozpoznania umożliwia wczesne włączenie leczenia, poprawę stanu pacjenta, ustąpienie dolegliwości i zapobieganie powikłaniom. Często czas jaki upływa od

pierwszych objawów do postawienia rozpoznania wynosi powyżej 12 miesięcy, zmiany są zaawansowane oraz obserwuje się powikłania np. pod postacią zaburzeń wzrastania, opóźnienia dojrzewania i/lub niedokrwistości.

Diagnostyka nieswoistych chorób zapalnych jelit opiera się na obrazie klinicznym, wynikach badań laboratoryjnych, endoskopowych z oceną histopatologiczną oraz obrazowych (usg, enterografia MRI). Ze względu na obserwowane u części chorych niecharakterystyczne zmiany makro- oraz mikroskopowe, inwazyjny charakter badań endoskopowych poszukiwane są nowe, nieinwazyjne testy służące do oceny toczącego się procesu chorobowego w przebiegu nieswoistych chorób zapalnych jelit u dzieci. Idealny marker powinien charakteryzować się wysoką czułością i specyficznością, niską inwazyjnością oraz łatwością powtórzenia. Dotychczas nie wykryto idealnego wskaźnika pozwalającego na jednoznaczne postawienie rozpoznania, ocenę zaawansowania zmian chorobowych oraz monitorowanie procesu leczniczego. Najczęściej stosowanym w praktyce klinicznej wskaźnikiem jest oznaczanie kalprotektyny w stolcu, jednakże nie jest ona specyficzna tylko dla nieswoistych chorób zapalnych jelit. Jej podwyższone stężenie obserwuje się w przebiegu alergii pokarmowej, w bieguncie infekcyjnej oraz nowotworach.

Z powyższych względów uważam, że podjęcie przez lek. Aleksandrę Czajkowską badań mających na celu **wykrycie nowych nieinwazyjnych markerów nieswoistych chorób zapalnych jelit** jest jak najbardziej uzasadnione i stanowi dojrzałą analizę tego zagadnienia.

Rozprawa doktorska lek. Aleksandry Czajkowskiej jest cyklem spójnych tematycznie trzech publikacji, w tym dwóch oryginalnych oraz jednej pogładowej o łącznej punktacji IF- 12,391, MNiSW-340. Należy podkreślić, że cykl publikacji jest optymalną i godną uznania formą rozprawy doktorskiej. Dowodzi bowiem dojrzałości naukowej doktoranta, umiejętności przejścia przez wszystkie etapy związane z przygotowaniem pracy naukowej: planowanie badania, jego przeprowadzenie, wnikliwą analizę otrzymanych wyników oraz przygotowanie manuskryptu do publikacji. Wcześniejsza publikacja wyników badań w recenzowanych czasopismach, stanowi dodatkową gwarancję wartości naukowej prezentowanych badań. Należy podkreślić, że lek. Aleksandra Czajkowska jest pierwszym autorem wszystkich prac stanowiących cykl.

Do rozprawy załączone zostały oświadczenia współautorów publikacji, z których jednoznacznie wynika, że udział Doktorantki w pracach był dominujący.

Przedstawiona do oceny praca cechuje się typowym układem dla rozpraw doktorskich. Została opatrzona spisem treści, wykazem publikacji stanowiących rozprawę doktorską, wykazem użytych skrótów (ułatwiającym identyfikowanie stosowanej w rozprawie terminologii), streszczeniem w języku polskim i angielskim.

We wstępie w formie przejrzystej przedstawiono hipotezę badawczą oraz cele pracy. Zasadniczą część stanowi wykaz publikacji stanowiących rozprawę doktorską z obszernym ich omówieniem oraz informacja na temat aktywności naukowej Doktorantki. Końcowy element rozprawy stanowi podsumowanie i wnioski oraz wykaz piśmiennictwa.

We wstępie doktorantka szczegółowo przedstawiła problem wzrastającej częstości występowania IBD, wczesnego wykrywania zmian w przebiegu nieswoistych chorób zapalnych jelit oraz braku idealnego markera diagnostycznego, monitorującego proces zapalny w tej grupie pacjentów.

Doktorantka w sposób przejrzysty sformułowała hipotezę badawczą oraz cele służące jej weryfikacji. Celem pracy doktorskiej było ustalenie możliwości zastosowania wybranych sfingolipidów, metaloproteinazy-9 macierzy pozakomórkowej (matrix metalloproteinase-9, MMP-9) i tkankowego inhibitora metaloproteinazy-1 macierzy pozakomórkowej (tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1, TIMP-1) jako markerów IBD oraz ocena korelacji wyżej wymienionych markerów z rutynowo oznaczanymi parametrami stanu zapalnego, z aktywnością kliniczną choroby wyrażoną w skalach PUCAI/PCDAI, z aktywnością endoskopową choroby w oparciu o skalę Mayo dla wrzodziejącego zapalenia jelita grubego oraz SES-CD dla choroby Leśniowskiego-Crohna, a także z oceną fenotypu według klasyfikacji paryskiej. Szczególnym atutem pracy jest to, że dotyczy ona populacji pediatrycznej. Badaniem objęto dzieci z nowo rozpoznanym IBD, hospitalizowane w Klinice Pediatrii, Gastroenterologii, Hepatologii, Żywienia i Alergologii Uniwersyteckiego Dziecięcego Szpitala Klinicznego w Białymstoku. Grupę porównawczą stanowiły dzieci z prawidłowym stężeniem kalprotektyny w stolcu, w tym samym przedziale wiekowym, po wykluczeniu choroby zapalnej przewodu pokarmowego.

Jak wspomniano zasadniczą część manuskryptu stanowi wykaz 3 publikacji stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej lek. Aleksandry Czajkowskiej z obszernym ich omówieniem.

Publikacje powyższe koncentrują się na zagadnieniach związanych z poszukiwaniem nieinwazyjnych markerów nieswoistych chorób zapalnych jelit u dzieci.

Pierwsza praca oryginalna opublikowana w *Biomolecules* : *Sfingolipid analysis indicate lactosylceramide as a potential biomarker of inflammatory bowel disease in children.*

przedstawia zagadnienie wykorzystania oznaczania sfingolipidów, ze szczególnym uwzględnieniem ceramidów jako markera nieswoistych chorób zapalnych jelit.

Badaniem objęto 73 dzieci z nowo rozpoznanym IBD, w wieku od 4-17 lat (34/73 z chorobą Leśniowskiego-Crohna, 39/74 z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego). Grupę kontrolną stanowiło 24 dzieci. Jakkolwiek brakuje dokładnego zdefiniowania grupy kontrolnej.

U wszystkich pacjentów oceniono stężenia lipidów (C16:0-Lactosylceramid, C14:0-Ceramid, C16:0-Ceramid, C18:0-Ceramid, C18:1-Ceramid, C20:0-Ceramid, C22:0-Ceramid, C24:0-Ceramid, C24:1-Ceramid, sfinganinę oraz sfingozynę) w surowicy krwi za pomocą ultra wysokosprawnej chromatografii cieczowej sprzężonej z tandemowym spektrometrem mas typu podwójny kwadrupol (UHPLC/MS/MS) według metody opisanej przez Bielawskiego i wsp. Otrzymane wyniki poddano analizie statystycznej. Wykazano znamienne wyższe stężenia ceramidów: C16:0-LacCer, C18:0-Cer, C18:1-Cer, C20:0-Cer oraz C24:0-Cer u pacjentów z IBD w porównaniu z grupą odniesienia (CD vs Cltr, UC vs Cltr).

Największa statystycznie różnica została stwierdzona dla C16:0-LacCer i dotyczyła dzieci z chorobą Leśniowskiego-Crohna w porównaniu z grupą z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego (2016,0 ng/ml vs 1611,2 ng/ml). Ponadto u dzieci z CD odnotowano wyższy poziom C18:0-Cer, natomiast tylko u pacjentów z UC stwierdzono wysokie wartości C24:0-Cer.

Dodatkowo wykazano znaczące różnice stężeń C18:0-Cer i C18:1-Cer pomiędzy grupami CD i UC. Najlepsze wartości diagnostyczne uzyskano dla C16:0-LacCer, który pozwolił ze 100% czułością oraz 100% swoistością odróżnić pacjentów z chorobą Leśniowskiego-Crohna od grupy kontrolnej. Oznaczenie stężenia C16:0-LacCer umożliwiło też różnicowanie pomiędzy wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego a grupą kontrolną (jednakże charakteryzowało się niższą czułością – 97.4% oraz swoistością-68.8%) oraz pomiędzy CD oraz UC (czułość-90.6%, swoistość 74,4%). Badanie to wydaje się być przydatne w codziennej pracy klinicznej, gdzie wielokrotnie postawienie ostatecznego rozpoznania nieswoistej choroby zapalnej jelit napotyka na trudności, szczególnie w populacji pediatrycznej. Ponadto w pracy dokonano oceny korelacji pomiędzy parametrami stanu zapalnego oraz ceramidami. W grupie pacjentów z chorobą Leśniowskiego-Crohna wykazano ujemną korelację pomiędzy stężeniem albuminy i hemoglobiny a wszystkim analizowanymi ceramidami oraz dodatnią korelację z ilością płytek krwi oraz wartością OB. Nie wykazano korelacji pomiędzy ceramidami a oceną endoskopową (SES_CD, MAYO), jednakże stwierdzono dodatnią korelację pomiędzy aktywnością CD (skala PCDAI) a C18:1-Cer oraz aktywnością UC (skala

PUCAI) a C24:0-Cer.

Wydaje się, że walorem pracy jest jednorodna grupa badana- pacjenci z nowo rozpoznanym IBD. Autorzy sami podkreślają, że słabą stroną, mogącą mieć wpływ na otrzymane wyniki badań są małe liczebnie grupy pacjentów.

W przedstawionym badaniu wykazano możliwość zastosowania pomiaru C16:0-LacCer w surowicy, jako czułego nieinwazyjnego markera w diagnostyce nieswoistych chorób zapalnych jelit. Ponadto uzyskane wyniki wskazują na zaburzenia glicerofosfolipidów, co może być wykorzystane do lepszego zrozumienia etiopatogenezy IBD oraz stworzenia nowych możliwości diagnostyczno-terapeutycznych.

Druga praca oryginalna opublikowana w Journal of Clinical Medicine: *Are Matrix metalloproteinase-9 and Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-1 useful as markers in diagnostic management of children with newly diagnosed ulcerative colitis?* dotyczy przydatności oznaczeń stężenia metaloproteinazy macierzy pozakomórkowej -9 (MMP-9) oraz tkankowego inhibitora metaloproteinaz-1 (TIMP-1) w surowicy i w kale jako nieinwazyjnych markerów do oceny klinicznej i endoskopowej aktywności IBD u pacjentów pediatrycznych z nowo rozpoznanym schorzeniem. Analizą objęto 35 dzieci z nowo rozpoznanym wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego, wieku 4-17 lat. Grupa porównawcza składała się z 20 dzieci. U wszystkich pacjentów oznaczono MMP-9 oraz TIMP-1 we krwi i w kale za pomocą metody immunoenzymatycznej ELISA, zgodnie z protokołem załączonym przez producenta. Ponadto wykonano barwienie immunohistochemiczne bioptatów jelita pobranych podczas kolonoskopii z użyciem przeciwciała przeciwko MMP-9, pozwalającym na lokalizację poddawanych ocenie białek. Otrzymane wyniki poddano analizie statystycznej. Wykazano znamienne wyższe stężenia MMP-9 oraz TIMP-1 w surowicy krwi dzieci z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego w porównaniu z grupą kontrolną. Stężenia badanych enzymów w kale były także istotnie wyższe w obydwu badanych grupach. Najlepsze wartości diagnostyczne uzyskano dla MMP-9 w kale, który pozwolił z 94,3% czułością oraz 72,2% swoistością odróżnić pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego od grupy kontrolnej. Ponadto w grupie badanej wykazano znamienne korelację stężenia MMP-9 w surowicy z CRP, WBC, PLT oraz aktywnością zmian błony śluzowej ocenionych w skali Mayo, a także zasięgiem zmian w skali Paryskiej. Wykazano również znamienne dodatnią korelację stężenia TIMP-1 w surowicy z CRP, OB., ilością PLT, skalą PUCAI oraz zasięgiem zmian wg skali Paryskiej. Nie udowodniono korelacji pomiędzy stężeniami MMP-9 i TIMP-1 w kale, a badanymi parametrami zapalnymi i endoskopowymi.

MMP-9 i TIMP-1 wydają się być przydatnymi nieinwazyjnymi markerami w diagnostyce wrzodziejącego zapalenia jelita grubego u dzieci. Przedstawione wyniki sugerują, że wysokie wartości badanych enzymów w surowicy krwi związane są z bardziej zaawansowanym procesem zapalnym jelit.

Niestety ujemną stroną pracy jest mała liczebnie grupa pacjentów, co wiąże się z rygorystycznymi kryteriami włączenia pacjentów, co mogło mieć pośrednio wpływ na uzyskane wyniki. Wskazane byłoby kontynuowanie badań w tym kierunku, co potwierdziłoby przydatność w/w markerów w codziennej pracy klinicznej w rozpoznaniu i monitorowaniu pacjentów pediatrycznych z nieswoistymi chorobami zapalnymi jelit.

Badania doktorantki doskonale wpisują się w trend poszukiwania bezpiecznych, nieinwazyjnych, a jednocześnie wiarygodnych markerów aktywności nieswoistych chorób zapalnych jelit.

Praca pogładowa: *Metabolomic profiling in children with inflammatory bowel disease*. została opublikowana w *Advances in Medical Sciences*. Należy podkreślić, że omawiana praca stanowi wartościowe kompendium nowoczesnej wiedzy na temat metabolomiki, dziedziny nauki zajmującej się badaniem metabolitów w materiale biologicznym.

Wykorzystanie tej dziedziny w badaniach nad nieswoistymi chorobami zapalnymi jelit być może pomoże w identyfikacji specyficznych biomarkerów biorących udział w patogenezie. W analizowanych publikacjach zwracano uwagę na możliwości zastosowania metabolomiki w celu wykrycia nieinwazyjnych markerów stanu zapalnego jelit, nowych rozwiązań diagnostyczno- terapeutycznych oraz wyjaśnienia mechanizmów etiopatogenetycznych nieswoistych chorób zapalnych jelit. Dotychczas przeprowadzone badania wykazały znaczące różnice w profilach metabolomicznych pacjentów z IBD. Praca opublikowana w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym umożliwia dostęp do niej szerokiemu gronu praktyków.

Staranna analiza wyników przeprowadzonych badań oraz danych dostępnych z piśmiennictwa pozwoliła na sformułowanie wniosków pozwalających na zweryfikowanie hipotezy badawczej oraz będących odpowiedzią na postawione cele badawcze.

Piśmiennictwo przedstawione w rozprawie zawiera 30 pozycji anglojęzycznych- zostało właściwie dobrane, dominują prace z ostatnich lat. Ponadto w każdej z publikacji będących podstawą cyklu prac zamieszczono aktualne, nowoczesne piśmiennictwo dotyczące omawianych zagadnień.

Zwraca uwagę niejednolity zapis publikacji oraz skrótów – niektóre zawierają tylko opis angielski, niektóre tylko polski, niektóre zarówno polski jak i angielski.

Poza drobnymi błędami edytorskimi praca jest napisana bardzo starannie i przejrzysto, a prezentowane w załączonych pracach ryciny i schematy są czytelne.

Poczynione drobne uwagi, nie wpływają na kompleksową, jednoznacznie pozytywną ocenę pracy zarówno pod względem merytorycznym, jak i redakcyjnym.

W podsumowaniu stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska lek. Aleksandry Czajkowskiej pt.: **Nowe nieinwazyjne markery nieswoistych chorób zapalnych jelit u dzieci.**”, będąca cyklem prac opublikowanych w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym spełnia wymagania stawiane rozprawom na stopień naukowy doktora nauk medycznych określonym w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. nr 65, poz 595 z późn.zm) oraz art. 179 ust. 1 ustawy z dnia 3 lipca 2018r. (Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce-Dz.U z 2018r. poz.1669 z późn.zm).

W związku z tym wnioskuję do Senatu Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku o dopuszczenie lek. Aleksandry Czajkowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Sabina Więcek

Dr hab.n.med. Sabina Więcek