

## Recenzja

**rozprawy na stopień doktora w dziedzinie nauk medycznych w dyscyplinie medycyna  
lek. Oresta Szczygielskiego „Poziom wybranych metaloproteinaz oraz ich inhibitorów w  
ślinie osób z rozszczepem szczęki”**

Rozszczep wargi i/lub podniebienia jest jedną z najczęściej występujących na świecie wad wrodzonych, głowy i szyi, dotykającą około 1 na 700 żywych urodzeń w ciągu roku. Obecnie wiemy, że pojawiają się on najczęściej na skutek zaburzeń embriogenezy między 4. – 7. oraz 5. – 12. tygodniem ciąży. W piśmiennictwie znajdujemy licznie publikowane badania kliniczne wskazujące, iż powstawanie rozszczepów podniebienia pierwotnego i wtórnego jest uwarunkowane genetycznie. Dotychczasowe badania pozwoliły na zidentyfikowanie kilku genów, które mogą odgrywać znaczącą rolę w przypadku rozszczepów jamy ustnej. Spośród nich szczególne znaczenie przypisywano: MSX1, IRF6, FOXE1, MAFB, WNT3, WNT9B, CRISPLD2, FGFR1, FGF8, BMP4 i region chromosomu 8q24. Ponadto sugerowano istotną rolę w przypadku innych genów np. TGF- $\beta$ 3, TGF- $\alpha$ , MMP-3, VAX1, ABCA4, AXIN2. Dodatkowo stwierdza się, iż rozszczepy jamy ustnej są wywołane przez wiele czynników, w tym środowiskowych, które powodują zmiany w specyficznych białkach sygnałowych i tym samym indukują rozszczep wargi i/lub podniebienia.

W badaniach opartych na poszukiwaniu genów aktywnych w czasie tworzenia struktur twarzoczaszki, szczególną uwagę zwraca się na geny kodujące składniki macierzy zewnątrzkomórkowej. Dotyczy to zarówno czynników wzrostu, ich receptorów, czynników transkrypcyjnych, białek strukturalnych oraz enzymów, wpływających na ich aktywność, czyli MMPs i ich tkankowych inhibitorów. Badania wykazały, iż MMP-2 i MMP-3 odgrywają istotną rolę w rozwoju podniebienia. W przypadku zakłócenia równowagi między MMPs a TIMPs może wystąpić proces rozszczepu wargi i/lub podniebienia. Dodatkowo, badania pokazują, iż przebudowa tkanek przy udziale MMPs odgrywa ważną rolę w późnych stadiach formowania wargi i podniebienia, zaś MMPs, razem z ich endogennymi inhibitorami TIMPs, są rzadko wykrywane w zdrowych tkankach. Ich ekspresja wzrasta w czasie fizjologicznego lub patologicznego remodelingu tkanek przy udziale cząsteczek sygnałowych, które są zdolne do zmiany ekspresji genów. W świetle przedstawionych faktów podjęcie przez lek. Ernesta Szczygielskiego problematyki analizy poziomu wybranych metaloproteinaz

*Ernesta Szczygielskiego*

oraz ich inhibitorów w ślinie osób z rozszczepem szczęki jako tematu rozprawy doktorskiej uważam za aktualne i celowe. Decydują o tym zarówno wartości praktyczne, jak i aspekty poznawcze, a badanie wpisuje się w nurt żywych dyskusji, toczących się na ten temat w piśmiennictwie.

Układ liczącej 88 stron druku komputerowej pracy, podzielony na rozdziały zawiera 6 tabel, 22 ryciny i 122 pozycje piśmiennictwa i jest typowy dla prac doktorskich. Dysertacja Pana Oresta Szczygielskiego ma staranną szatę edycyjną, jest napisana czytelnym, przejrzystym językiem ułatwiającym czytelnikowi jej lekturę.

W rozdziale „Wstęp” Pan Orest Szczygielski w sposób przejrzysty zestawił etiopatogenezę wad rozszczepowych szczegółowo opisując ich rodzaje, występowanie i etiologię. Następnie wychodząc od charakterystyki ogólnej śliny opisał ją jako materiał diagnostyczny, podkreślając łatwe i nieinwazyjne pobieranie i fakt iż metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej mogą również być wykrywane w tym materiale biologicznym. Kolejno, w sposób logicznie ułożony, zestawił charakterystykę i podział metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej, skupiając uwagę na budowie strukturalnej MMPs, regulacji aktywności metaloproteinaz oraz znaczeniu MMP-3 i MMP-9 w chorobach twarzoczaszki.

**Przedstawione we „Wstępie” dane uzasadniają celowość podjęcia się przez Doktoranta badań, a zastosowanie materiału diagnostycznego zasługuje na uznanie ze względu na małą czasochłonność i łatwość pozyskania go do śledzenia oceny przydatności diagnostycznej MMP-3, MMP-9 i TIMP-3 u pacjentów z rozszczepem wargi i/lub podniebienia, sugerując, że enzymy te mogą odgrywać rolę w patogenezie tego schorzenia. Wartość tej części rozprawy doktorskiej a tym samym przygotowanie teoretyczne Doktoranta Pana Oresta Szczygielskiego oceniam bardzo dobrze.**

Doktorant w rozdziale „Cel pracy” za cel główny rozprawy postawił oznaczenie stężenia metaloproteinazy MMP-3 i MMP-9 oraz tkankowego inhibitora metaloproteinaz – TIMP-3 – w ślinie pacjentów dotkniętych rozszczepem wargi i / lub szczęki. Zdefiniował też prawidłowo dwa szczegółowe cele pracy. Pierwszy to ocena stężenia metaloproteazy MMP-3 i MMP-9 i ich inhibitora TIMP-3 w ślinie osób z rozszczepami twarzoczaszki w porównaniu ze stężeniem tych MMPs i inhibitora u pacjentów zoperowanych z powodu wady rozszczepowej jak i u osób bez wady rozszczepowej. Drugi to ocena współwystępowania MMP-3, MMP-9 i TIMP-3 z rozszczepem twarzoczaszki określona poprzez wyliczenie

*Złencube*

czułości i swoistości diagnostycznej, dodatniej i ujemnej wartości predykcyjnej (PPV, NPV) oraz mocy diagnostycznej testu, poprzez analizę pola powierzchni pod krzywą ROC (AUC). **Podkreślam: praca doktorska została logicznie zaplanowana, a jej cele określono jasno i precyzyjnie.**

W rozdziale „**Material i metody**” Pan Orest Szczygielski zestawiał dane, łącznie 120 włączonych do badania osób, podzielonych na trzy grupy. Pierwszą grupę stanowiło 40 pacjentów z rozszczepem twarzoczaszki leczonych w Klinice Leczenia Wad Twarzoczaszki Formmed (Babice Nowe koło Warszawy, kierownik prof. dr hab. n. med. Zofia Dudkiewicz). Do drugiej grupy zakwalifikowano 40 pacjentów którzy przeszli z sukcesem operację z powodu rozszczepu wargi i / lub podniebienia. Grupa kontrolna składała się z 40 osób bez rozszczepu twarzoczaszki. Średni wiek badanych wynosił 8,5 roku, zwraca tu uwagę fakt, że zakres jest bardzo szeroki: 0,9 - 20 lat, brak też danych w jakim czasie wykonano prezentowane w pracy badania oraz czy grupy pierwsza i druga (całkowicie lub nie) nachodziły na siebie. Niestety w przekazanej mi do zrecenzowania rozprawie nie umieszczono informacji o uzyskaniu zgody lokalnej Komisji Bioetycznej na prowadzenie badań. Nie znalazłam też informacji o kryteriach włączających i wyłączających oraz uzyskaniu pisemnej zgody pacjentów, rodziców lub opiekunów prawnych na przeprowadzenie badań. Postuluję uzupełnić te informacje przy przygotowywaniu publikacji do druku.

W omawianym rozdziale w sposób szczegółowy opisano natomiast proces pobierania i przechowywania materiału diagnostycznego – śliny oraz oznaczenie metaloproteinaz (MMP-3, MMP-9) oraz inhibitora TIMP-3, metodą immunoenzymatyczną (ELISA automatyczny czytnik płytek FL 600 firmy BIO-TEK) z wykorzystaniem odczynników firmy R&D Systems. Wybrana do pracy metoda ELISA jest powszechnie stosowana i charakteryzuje się wysoką czułością i swoistością.

Analiza statystyczna została przeprowadzona prawidłowo z zastosowaniem nowoczesnych, adekwatnych metod. Użyto program STATISTICA 10.0, a ponieważ wstępna analiza wyników badań (test chi-kwadrat) wykazała, że rozkład stężeń analizowanych parametrów nie był zgodny z rozkładem normalnym, to do analizy statystycznej różnic pomiędzy pacjentami z rozszczepami wargi i/lub podniebienia a grupą kontrolną zastosowano nieparametryczny test U-Manna-Whitneya oraz test Wilcoxon. Analogicznie jak w przypadku innych prac naukowych w doktoracie Pana Oresta Szczygielskiego wyniki uznano za istotne statystycznie na poziomie istotności  $p < 0.05$ .

Rozdział „Wyniki” rozpoczyna tabelarycznie zestawiona ocena stężenia MMP-3, MMP-9 oraz TIMP-3 u pacjentów z rozszczepami wargi i/lub podniebienia oraz osób zdrowych. Przeprowadzona analiza wskazuje że, u osób które cierpiały na rozszczep i są już po operacji, wartość MMP-3 spada o blisko 2/3 w stosunku do wartości u osób, które jeszcze nie przeszły operacji (znamiennosc statystyczna  $p < 0,001$ ). Ponadto u osób zdrowych, które nigdy nie cierpiały na rozszczep, wartości MMP-3 są bardzo zbliżone do poziomu obserwowanego u chorych leczonych. Obserwacja ta ma ważne implikacje praktyczne. Stwierdzono, że w przypadku osób chorych na rozszczepienie wargi szczęki/podniebienia, którzy jeszcze nie byli operowani wartości MMP-9 są prawie takie same jak u pacjentów u których wykonana została operacja naprawcza (brak znamienności statystycznej pomiędzy grupami). Warto podkreślić, że osoby zdrowe, które nigdy nie cierpiały z powodu rozszczepienia mają wartości o około 30-40% wyższe od osób z rozszczepami (znamiennosc statystyczna  $p < 0,001$ ). Jeszcze inaczej przedstawia się sytuacja w przypadku TIMP-3. Pacjenci, którzy byli operowani mają poziom TIMP-3 nieznacznie wyższy w stosunku do poziomu obserwowanego u osób z rozszczepem, które jeszcze nie przeszły operacji (brak znamienności statystycznej). Dzięki czytelnym rycinom Doktorant pokazał, że poziom TIMP-3 u pacjentów po operacji jest taki sam jak u osób zdrowych, które nigdy nie miały rozszczepu.

Następnie w sposób przejrzysty – graficznie – Pan Orest Szczygielski przedstawia ocenę współwystępowania MMP-3, MMP-9 oraz TIMP-3 z rozszczepieniem poprzez wyliczenie czułości i swoistości diagnostycznej, dodatniej i ujemnej wartości predykcyjnej (PPV, NPV) oraz mocy diagnostycznej testu, poprzez analizę pola powierzchni pod krzywą ROC (AUC). Wiele wyników wyjaśnia analizowane zależności, ale jest też inspirujących do dalszych badań. Zwraca wagę solidny, oparty na gruntownych podstawach klinicznych warsztat pracy, co jest z pewnością zasługą Doktoranta, ale wynika też z osoby Promotora. **Moim zdaniem wyniki badań są udokumentowane właściwie, za pomocą czytelnich rycin oraz tabel. Szczegółowo i punkt po punkcie w pracy zbadano wszystkie zależności uzyskane w materiale badanym w poszczególnych grupach oraz poddano je prawidłowo analizie statystycznej.**

Dopełnieniem całości części teoretycznej i analiz statystycznych jest interpretacja oraz dyskusja uzyskanych przez Doktoranta Pana Oresta Szczygielskiego rezultatów badań własnych. Rozdział „Dyskusja” rozprawy stanowi próbkę wnikliwości badawczej Doktoranta jego kompetencji naukowych i klinicznych, umiejętności analitycznych, jego wiedzy,

*Złencurko*

swobody w ocenianiu i rozumieniu problemów związanych z realizowanym tematem badawczym doktoratu. **W świetle zawartych w rozdziale treści Autor jawi się nie tylko jako badacz rzetelny, lecz także dokładny i kompetentny. Uważam, że dyskusja jest rzeczowa i prowadzona na odpowiednim poziomie.** Z pracy wynikają trzy logiczne wyprowadzone wnioski:

1. Leczenie chirurgiczne przywracające poprawne stosunki anatomiczne powoduje że wartości MMP-3 osiągają taki sam poziom jak u osób zdrowych. Ten fakt dowodzi że MMP3 bierze w udział patogenezie rozszczepów wargi i/lub podniebienia.
2. Wyniki tej pracy wskazują także na związek pomiędzy stężeniem MMP-9 i rozszczepem wargi i/lub szczęki i podniebienia sugerując, że może odgrywać rolę w patologii tego schorzenia.
3. TIMP-3 nie wykazuje odchylenia od poziomu obecnego u osób zdrowych i nie ulega zmianie po leczeniu chirurgicznym, tym samym wydaje się nie brać udziału w patologii rozszczepów.

Rozdział „Piśmiennictwo” zawiera 122 prawidłowo dobranych i wykorzystanych pozycji literaturowych. **W dysertacji Doktorant Pan Orest Szczygielski wykorzystał różnorodne źródła bibliograficzne dotyczące obszaru wiedzy medycznej i nauk o zdrowiu wymagające dużego nakładu pracy i zaangażowania przy opracowaniu zagadnienia.** Należy podkreślić właściwy dobór piśmiennictwa (w większości – 96% – angielskojęzycznego) oraz jego umiejętne przytaczanie i interpretowanie. Przy przygotowaniu pracy do publikacji należało by jednak je uaktualnić. Na 122 cytowane pozycje 13 jest z ostatnich 5 lat (2019 trzy pozycje, 2018 jedna, 2017 trzy pozycje, 2016 pięć pozycji, 2015 jedna).

Za najcenniejsze w recenzowanej pracy, uważam podjęcie ciekawego, nadal zbyt mało jeszcze poznanego tematu rozszczepu wargi i/lub podniebienia wywołującego zarówno konsekwencje medyczne, psychologiczne, socjologiczne jak i ekonomiczne. W podsumowaniu uważam, że Doktorant wywiązał się ze swojego zadania szczegółowo charakteryzując grupę metaloproteazy MMP-3 i MMP-9 i ich inhibitora TIMP-3 w ślinie osób z rozszczepami twarzoczaszki. Szczególną uwagę poświęcił pacjentom z rozszczepem szczęki, wadzie wrodzonej u dzieci, przekładającej się na rozwój fizyczny, psychiczny i społeczny. **Podkreślam: rozszczep wargi i/lub podniebienia jest jedną z najcięższych wad rozwojowych charakteryzującą się tym, że jej leczenie jest wieloetapowe i wieloletnie, a**

*Złachwa*

stygmat w zakresie wyglądu twarzy lub zaburzenia mowy często pozostają na zawsze, mimo długotrwałego i złożonego leczenia chirurgicznego, ortodontycznego, czy stosowania terapii mowy. W przedstawionej do recenzji pracy Pan Orest Szczygielski wykazał umiejętność właściwego podejścia i analizy problemu klinicznego oraz samodzielnego jego rozwiązania, a także niezbędną dojrzałość i krytycyzm naukowy.

Rozprawa doktorska nie jest wolna od pewnych uchybień, np. wykaz używanych skrótów jest niekompletny i nie jest ułożony alfabetycznie. Niewielkie drobne błędy, głównie interpunkcyjne (np. kropki na końcu tytułu rozdziału str. 42, czy podrozdziału str. 27, 49), edytorskie (np. brak justowania str. 42) i literowe nie umniejszają wartości pracy. Jestem przekonana, że po uzupełnieniu opisu materiału i metody, odpowiednim podzieleniu i opracowaniu redakcyjnym oraz uaktualnieniu piśmiennictwa, wyniki zostaną szybko przedstawione w renomowanych czasopismach naukowych, stanowiąc istotny wkład w rozwój nauki.

Rozprawa Pana lek. Oresta Szczygielskiego budzi zainteresowanie, co wynika z aktualności omawianej tematyki, jak i znaczenia klinicznego. Podsumowując stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji dysertacja lek. Oresta Szczygielskiego spełnia warunki stawiane pracom na stopień doktora określone w art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (tj. Dz. U. z 2017 r., poz. 1789). Upoważnia mnie to do przedstawienia Kolegium Wydziału Nauk o Zdrowiu Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku wniosku o dopuszczenie kandydata do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Białystok 26.10.2020

