

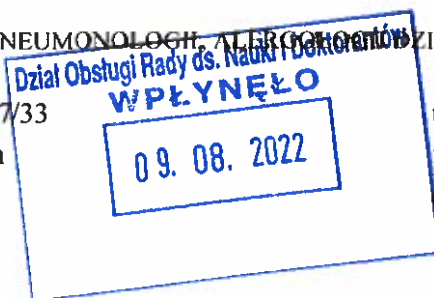


UNIwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

III Katedra Pediatrii

Klinika Pneumologii, Alergologii Dziecięcej i Immunologii Klinicznej

ul. Szpitalna 27/33  
60-572 Poznań



tel.: 61 8491313

fax: 61 8480111

e-mail: [klinikapad@skp.ump.edu.pl](mailto:klinikapad@skp.ump.edu.pl)

Dr hab. n. med. Irena Wojsyk-Banaszak

Klinika Pneumologii, Alergologii Dziecięcej i Immunologii Klinicznej

III Katedra Pediatrii

Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Poznań, 01.08.2022

### **Recenzja Rozprawy na stopień doktora nauk medycznych**

Lekarza medycyny Agnieszki Strzelak

pt. „Możliwości zastosowania oznaczenia IP-10 w diagnostyce zakażenia latentnego *Mycobacterium tuberculosis* i aktywnej gruźlicy u dzieci.”

Gruźlica u dzieci stanowi istotny chociaż często niedoceniany problem zdrowotny. Wg danych WHO zakażonych prątkiem gruźlicy jest 25 mln ludzi na świecie. W Polsce zapadalność na gruźlicę wynosiła w 2020 roku 8,8 na 100 tys mieszkańców. U dzieci do 14 rż odnotowano 39 przypadków gruźlicy, a u starszych nastolatków 49 zachorowań co łącznie stanowi 1,5% zachorowań w naszym kraju. Niemniej dane epidemiologiczne dotyczące gruźlicy u dzieci wydają się niedoszacowane co wynika z trudności diagnostycznych w tej grupie wiekowej.

W tym kontekście praca doktorska lek. med. Agnieszki Strzelak stanowi pozycję niezwykle wartościową. Doktorantka podjęła się analizy wartości diagnostycznej indukowanego przez interferon gamma białka o masie cząsteczkowej 10 kDa (IP-10) w surowicy krwi jak i w płynie z płukania oskrzelowo-pęcherzykowego w diagnostyce zakażenia prątkiem gruźlicy, różnicowania zakażenia aktywnego od zakażenia utajonego oraz monitorowania leczenia.

Praca doktorska liczy łącznie z piśmiennictwem i załącznikami 164 strony, z tego 26 stron stanowi „Wstęp”, 2 strony „Założenia i cel pracy” „Metodyka badania – 12 stron, „Wyniki” – 51

metod. Rozdział podzielono na dwie części, w których Autorka opisała oddzielnie metodologię obu części badania.

Wyniki obu części badania przedstawione są w 28 tabelach (7-34) i na 38 rycinach (2-39) w sposób uporządkowany i logiczny. Doktorantka opisała sposób rekrutacji pacjentów do badania, scharakteryzowała grupy badane oraz przedstawiła wyniki badań immunologicznych i oznaczeń białka IP-10 ich zależność od wieku dzieci oraz zależności pomiędzy poszczególnymi oznaczanymi parametrami. Ocenie poddała również przydatność poszczególnych oznaczeń w diagnozowaniu gruźlicy.

Autorka opisała objawy występujące u 33 dzieci z podejrzeniem klinicznym gruźlicy. Do najczęściej zgłaszanych objawów chorobowych należały przewlekły kaszel u prawie połowy, gorączka i/lub stany podgorączkowe (n = 10), nielecząca się infekcja układu oddechowego (n = 7), pogorszenie łaknienia (n=6) oraz spowolnienie wzrostu lub spadek masy ciała (n = 6). Do pozostałych zgłaszanych objawów zaliczały się nadmierna potliwość (n = 5), płyn w jamie opłucnej (n = 4), bóle kostno-stawowe (n = 3), limfadenopatia obwodowa (n = 2), bóle brzucha (n = 2), ból w klatce piersiowej (n = 1) i osłabienie (n = 1). Dla 17 pacjentów powodem diagnostyki były nieprawidłowości w RTG klatki piersiowej. Aktywną gruźlicę rozpoznano ostatecznie u 13 z 33 dzieci, które zgłosiły się z powodu ww objawów klinicznych. U pozostałych pacjentów przyczyną obserwowanych objawów były inne infekcje układu oddechowego (n = 11) oraz co budzi duży niepokój u dzieci i młodzieży, stwierdzano też nikotyzm.

Niejako „przy okazji” Doktorantka ujawniła, że 3,6% badanych dzieci nie była szczepiona BCG po urodzeniu. Ciekawym byłoby poznanie przyczyny takiego stanu rzeczy.

Doktorantka wykazała istotne statystycznie różnice w stężeniu IP-10 po stymulacji mitogenem oraz swoistymi antygenami prątka pomiędzy badanymi grupami. Dzieci zakażone prątkiem gruźlicy prezentowały wyższe stężenia IP-10 po stymulacji mitogenem niż dzieci niezakażone, a w przypadku stymulacji swoistymi antygenami prątka obserwowano również istotnie wyższe stężenia IP-10 u dzieci z aktywną gruźlicą w porównaniu z grupą z utajonym zakażeniem prątkiem gruźlicy. Co ciekawe nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w stężeniu IP-10 bez stymulacji pomiędzy grupą zakażoną i niezakażoną prątkiem gruźlicy ani pomiędzy dziećmi z ATB i LTBI. Istotne statystycznie różnice w stężeniu IP-10 bez stymulacji wykazano jedynie pomiędzy dziećmi z kontaktu z gruźlicą w porównaniu do dzieci z LTBI, objawowych dzieci z ostatecznym rozpoznaniem innym niż gruźlica (nie TB) oraz dzieci z grupy kontrolnej.

Bardzo wartościowe z klinicznego punktu widzenia jest porównanie stężenia IP-10 u dzieci hospitalizowanych z powodu podejrzenia klinicznego gruźlicy w zależności od

stron, „Omówienie” – 31 stron, „Wnioski” 1 strona, zamieszczono też streszczenia w języku polskim i angielskim, spis tabel i rycin, wykaz stosowanych skrótów i piśmiennictwa liczącego 213 pozycji literaturowych opinie Komisji Bioetycznej przy Warszawskim Uniwersytecie Medycznym oraz oświadczenie lek Anny Komorowskiej-Piotrowskiej dotyczące osoby głównego badacza, którym jest lek. Agnieszka Strzelak.

Została zachowana właściwa proporcja między poszczególnymi częściami rozprawy doktorskiej. Cytowane piśmiennictwo jest dobrze dobrane, aktualne. Podział rozdziałów: „Wstęp”, „Materiał i metody” „Wyniki” i „Dyskusja” na podrozdziały czyni opracowanie przejrzystym. Na uznanie zasługuje jasny i przejrzysty styl pracy, a zilustrowanie wyników rycinami i tabelami ułatwia zrozumienie tematu. Praca jest napisana starannie, a drobne uchybienia edytorskie nie umniejszają jej wartości.

Rozprawę doktorską rozpoczyna syntetyczny Wstęp, który wprowadza w zagadnienia poruszane w pracy. Na początku Doktorantka opisuje patofizjologiczne uwarunkowania choroby, jej epidemiologię ze szczególnym uwzględnieniem danych polskich, klasyfikację oraz odrębności wieku dziecięcego. Autorka przedstawia dostępne metody diagnostyczne gruźlicy, ich zalety i ograniczenia oraz zasady interpretacji dostępnych badań zalecane w konsensusach Towarzystw naukowych. Ta część pokazuje bardzo dobre przygotowanie Doktorantki do prowadzenia badań. W dalszej części Doktorantka opisuje nowe biomarkery zakażenia prątkiem gruźlicy, przedstawia też charakterystykę badanego białka IP-10, jego rolę w zakażeniu prątkami gruźlicy. Zwraca uwagę na niedostatecznie poznaną rolę markera IP-10 w gruźlicy u dzieci, brak badań oceniających ryzyko progresji do pełnoobjawowej postaci choroby u dzieci zakażonych prątkiem czy też przydatność IP-10 w różnicowaniu przyczyn objawów oddechowych u dzieci zakażonych prątkiem i niezakażonych.

Cel pracy stanowi rozwinięcie tytułu rozprawy. Autorka przedstawiła cel główny, jakim była ocena przydatności zastosowania oznaczenia stężenia IP-10 w diagnostyce gruźlicy i monitorowaniu leczenia przeciwprątkowego u dzieci. Cel realizowano w dwóch grupach badanych. W pierwszej części pracy Doktorantka oceniała przydatność oznaczenia stężenia IP-10 po stymulacji swoistymi antygenami prątka w surowicy w diagnostyce zakażenia prątkiem u dzieci oraz w monitorowaniu leczenia. W tej części pracy Doktorantka postawiła 6 celów szczegółowych. W drugiej części pracy Autorka porównywała stężenie IP-10 w płynie z płukania oskrzelowo-pęcherzykowego u dzieci z gruźlicą i innymi chorobami układu oddechowego.

Kolejny rozdział stanowi opis szczegółowych kryteriów włączenia i wyłączenia z badania, kwalifikacji do grup badanych i kontrolnych, opis przebiegu badania oraz stosowanych

ostatecznego rozpoznania. Stężenie IP-10 było istotnie wyższe u dzieci z aktywną gruźlicą w porównaniu do dzieci, u których ostatecznie rozpoznano inną chorobę, a wśród diagnozowanych z powodu kontaktu z osobą chorą na gruźlicę, stężenie IP-10 było znacząco wyższe u dzieci zakażonych prątkiem (ATB i LTBI łącznie) w porównaniu do dzieci niezakażonych. Niestety oznaczenie stężenia IP-10 nie pozwala na rozstrzygnięcie wątpliwości diagnostycznych u chorych z rozbieżnymi wynikami TST i QFT-GIT.

Autorka wykazała również przydatność oznaczeń IP-10 w monitorowaniu leczenia przeciwprątkowego. Stężenie IP-10 po stymulacji rekombinowanymi antygenami prątka gruźlicy w przeciwieństwie do stężenia IFN- $\gamma$  obniżało się po 2 miesiącach leczenia przeciwprątkowego u dzieci z aktywną gruźlicą ale nie w grupie dzieci z utajonym zakażeniem prątkiem gruźlicy i niezakażonych dzieci z kontaktu z gruźlicą.

W części poświęconej ocenie wartości diagnostycznej oznaczenia białka IP-10 Doktorantka posłużyła się krzywymi ROC. Przy zastosowaniu optymalnych punktów odcięcia dla stężenia IP-10 po stymulacji rekombinowanymi antygenami prątka Autorka wykazała bardzo dobrą wartość dyskryminacyjną tego biomarkera ( $AUC > 0,9$ ) w identyfikowaniu osób zakażonych prątkiem gruźlicy we wszystkich zbadanych układach., większą niż IFN- $\gamma$  we wszystkich zestawieniach, dla których uzyskano istotność statystyczną. W grupie dzieci z aktywną gruźlicą TST cechowało się największą czułością, która wyniosła 93%, wyższą niż IP-10 (79%) i test QFT-GIT (72%). Najwyższą swoistością z kolei cechował się test QFT-GIT (83%), następnie IP-10 (81%) i TST (69%). Łączna ocena IP-10 i QFT-GIT charakteryzowała się czułością 88% (nadal niższą niż 93% dla TST).

W drugiej części pracy Autorka porównywała stężenie IP-10 w niestymulowanym antygenami prątka płynie z płukania oskrzelowo-pęcherzykowego u dzieci z zakażeniem prątkiem gruźlicą oraz u dzieci z innymi chorobami układu oddechowego. W tej grupie znaleźli się chorzy na astmę, choroby śródmiąższowe płuc, z wadami płuca oraz chorobami infekcyjnymi układu oddechowego, u których wykluczono kontakt z osobą chorą na gruźlicę oraz wcześniejsze leczenie z powodu gruźlicy. Doktorantka nie stwierdziła różnic w stężeniu IP-10 w surowicy ani w płynie z płukania oskrzelowo-pęcherzykowego u dzieci z grupy kontrolnej i badanej. Stężenia IP-10 w oby badanych materiałach biologicznych nie były zależne od wieku dzieci.

Omówienie wyników przeprowadzone jest w sposób systematyczny wraz z krytyczną analizą i świadczy o bardzo dobrej znajomości zagadnienia i dojrzałości naukowej Autorki. W rozdziale przeanalizowano piśmiennictwo dotyczące oznaczeń IP-10 zarówno bez jak i po stymulacji mitogenem i antygenami prątka w diagnostyce gruźlicy. Doktorantka przytacza publikacje, których autorzy pokazują sprzeczne i wzajemnie wykluczające się wyniki oraz

konfrontuje je z wynikami swojej pracy. Podkreśla równocześnie, że chemokina ta nie jest swoista dla zakażenia *Mycobacterium tuberculosis*, a jej podwyższone stężenia obserwowano również w infekcjach innymi patogenami i chorobach autozapalnych. Na rozbieżność wyników mogą wpływać dodatkowo zastosowane przez badaczy różne metody laboratoryjne.

Autorka podkreśla nowatorski charakter swoich badań, który w opinii recenzentki wart jest pochwały. Opracowanie stanowi największe badanie prospektywne oceniające zastosowanie IP-10 w diagnostyce gruźlicy u dzieci w kraju o niskiej zapadalności na tę chorobę. Doktorantka starała się wykazać przydatność oznaczeń w konkretnych sytuacjach klinicznych jakie stanowi diagnostyka gruźlicy u dzieci prezentujących objawy ze strony układu oddechowego oraz u dzieci bez objawów klinicznych a po kontakcie z osobą chorą na postać płucną gruźlicy co również budzi uznanie recenzentki. Ponadto w przedstawianej pracy po raz pierwszy wykazano przydatność IP-10 w monitorowaniu leczenia przeciwprątkowego u dzieci i pierwsza, w której oceniano stężenie IP-10 w płynie z płukania oskrzelowopęcherzykowego u dzieci diagnozowanych w kierunku gruźlicy.

Sformułowane wnioski są adekwatne do celu pracy i poparte wynikami. Wniosek drugi jest odzwierciedleniem pewnego skrótu myślowego Autorki, bowiem „brak istotnej zależności pomiędzy stężeniem IP-10 po stymulacji mitogenem od wieku pozwala na wykorzystanie tego biomarkera” niezależnie od wieku a nie tylko „w grupie najmłodszych dzieci.”

Z obowiązku recenzenta poniżej załączam drobne uwagi do pracy, które nie wpływają na moją wysoką ocenę:

1. Autorka w wykazie skrótów nie podaje stosowanego często w pracy skrótu „ATB”
2. W rozdziale “Wstęp” (str 27) Autorka podaje : „Wskaźnik ten jest jednak w Polsce nadal około 2-3 razy wyższy niż w krajach Europejskiego Obszaru Gospodarczego” podczas gdy nasz kraj do Europejskiego Obszaru Gospodarczego należy.
3. Klasyfikując gruźlicę (str 29) Doktorantka tłumaczy pojęcie PRESUMPTIVE DIAGNOSIS jako „gruźlicę przypuszczalną”. Wydaje się, że właściwszym byłoby określenie „domniemana”
4. W rozdziale “Wstęp” (str 36, 39, 40) Autorka kilkakrotnie pisze o „ekspresji IFN- $\gamma$  przez limfocyty krwi obwodowej” podczas gdy właściwsze jest określenie „wydzielanie IFN- $\gamma$  co zresztą też znalazło swoje miejsce w tekście (też str 39).
5. Weryfikacji wymaga odniesienie do pozycji literaturowej Tabeli 2 .
6. Doprecyzowania wymaga 1 cel szczegółowy pierwszej części badania. Co dokładnie oznacza „w każdej z badanych grup”?
7. Brakuje przedstawienia zasad rekrutacji grup kontrolnych (Materiały i metody”)

8. W rozdziale „Wyniki” (str 70) brakuje opisu nieinfekcyjnych chorób układu oddechowego, które rozpoznano u dzieci diagnozowanych z powodu podejrzenia klinicznego gruźlicy, u których ostatecznie postawiono inne rozpoznanie
9. Na niektórych rycinach, szczególnie obrazujących porównania kilku grup np. Ryc 8, 10, 22 Autorka nie zamieściła informacji, czy zmiany osiągnęły istotność statystyczną
10. Czy Ryciny 15, 16 i 17 przedstawiają stężenia IP-10 bez czy po stymulacji (rozbieżność w tekście i opisie Ryciny)?
11. Poziom istotności statystycznej różnicy w stężeniu IP-10 po stymulacji swoistymi antygenami prątka gruźlicy u dzieci przed i od piątego roku życia różni się na Rycinie (26 str 88) i w tekście Rozprawy (str 87).
12. Rycina 28 nie pokazuje zmniejszenia stężenia badanych biomarkerów w grupie dzieci z utajonym zakażeniem prątkiem gruźlicy i niezakażonych dzieci z kontaktu z gruźlicą jak podano w tekście rozprawy (str 89).
13. Wyjaśnienia wymaga zawarta w podrozdziale 4.1.7 próba porównania stężeń różnych biomarkerów: „Obserwowane stężenia IP-10 po stymulacji antygenami prątka, po stymulacji mitogenem i bez stymulacji były około 50-500 razy wyższe niż odpowiednie stężenia IFN- $\gamma$ ”. Właściwe byłoby porównanie skali zmian poszczególnych wskaźników, a nie ich stężeń.
14. Pojedyncze literówki, np: „stężenie” zamiast „stężenia” (str 17) „aktywną” zamiast „aktywną” (str 86);
15. Drobne uchybienia natury językowej, np: „gdzie mogą zostać usunięte” (str 24) powinno być „skąd mogą zostać usunięte”; „przy jednoczesnym zbyt niskim stężeniem” (str 133) powinno być „przy jednoczesnym zbyt niskim stężeniu”.

Pomimo kilku uwag natury porządkującej, pragnę podkreślić, że nie zmniejszają one wartości merytorycznej zarówno przeprowadzonych badań jak i wnioskowania.

Reasumując mogę stwierdzić, że rozprawa doktorska Lekarka medycyny Agnieszki Strzelak dotyczy ważnego zagadnienia jakim jest diagnostyka gruźlicy u dzieci. Na szczególną uwagę zasługuje kliniczny potencjał skrupulatnie przeprowadzonych, szeroko zakrojonych badań oraz ich nowatorski charakter. Rozprawa jest opracowaniem bardzo wartościowym i powinna zachęcać do dalszych badań, a jej wyniki warte są upowszechnienia. Koncepcja pracy, jej perspektywny charakter i długofalowy przebieg, interpretacja wyników zasługują na uznanie. Lekarka medycyny Agnieszka Strzelak udowodniła Rozprawą, że posiada wiedzę i umiejętność prowadzenia badań naukowych.

Rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach naukowych i tytule w zakresie sztuki

(Dz.U. nr 65, poz.595 z późn. zm.) w związku z art. 179 ust.1 ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018 r. poz. 1669 z późn. zm.)”.

W związku z powyższym przedkładam Radzie Dyscyplin Nauk Medycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego wniosek o dopuszczenie Lekarz medycyny Agnieszki Strzelak do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie, z uwagi na dużą wartość merytoryczną pracy, wnoszę o jej wyróżnienie.

Dr hab. n. med. Irena Wojsyk-Banaszak



dr hab. n. med. Irena Wojsyk-Banaszak  
Specjalista pediatrii, chorób płuc  
i chorób płuc dzieci  
6390183