

Prof. dr hab. n. med.

Wanda Furmaga-Jabłońska

Klinika Patologii Noworodków i Niemowląt

Uniwersytetu Medycznego w Lublinie

RECENZJA

ROZPRAWY DOKTORSKIEJ MGR MAGDALENY KOŁODZIEJ PT.: „WYKORZYSTANIE TECHNIK BIOMEDYCZNEGO OBRAZOWANIA MOLEKULARNEGO W MODELU ZWIERZĘCYM DYSPLAZJI OSKRZELOWO-PŁUCNEJ”

PROMOTOR: PROF. DR HAB. MARIAN CHOLEWA

PROMOTOR POMOCNICZY: DR N. MED. WITOLD BŁAŻ

ZLECONA PRZEZ PROREKTORA DS. KOLEGIUM NAUK MEDYCZNYCH
PROF. DR HAB. N. MED. ARTURA MAZURA DN. 01.07.2022R.

Dysplazja oskrzelowo-płucna (BPD) jest chorobą występującą u noworodków urodzonych przedwcześnie <32 tygodnia ciąży, zwłaszcza w grupach wcześniaków z bardzo małą masą ciała, tj. 1500-1000g (VLBW) i ekstremalnie małą masą ciała, tj.<1000g (ELBW). Jak wynika z danych WHO wraz ze wzrostem przeżywalności skrajnie niedojrzałych noworodków obserwuje się stały wzrost liczby wcześniaków, u których rozwija się BPD. Należy podkreślić, że dysplazja oskrzelowo-płucna jest jedną z głównych przyczyn częstej zachorowalności i umieralności wcześniaków podczas hospitalizacji bezpośrednio po urodzeniu oraz po wypisie ze szpitala. Do najczęstszych problemów klinicznych dzieci z BPD należą zaburzenia i problemy oddechowe (nawracające epizody bezdechów i obturacji, przewlekły kaszel, nawracające zakażenia wirusowe dróg oddechowych, zwiększona częstość występowania astmy oskrzelowej), niedobory żywieniowe, które powodują zaburzenia rozwoju fizycznego i wzrastania, a ciężki przebieg choroby może być również

przyczyną opóźnienia rozwoju psychoruchowego i trudności poznawczych w dalszych latach życia.

Etiopatogeneza BPD jest wieloczynnikowa, a rozwój choroby zależy zarówno od czynników wewnątrzmacicznych jak i zewnątrzmacicznych. Do rozwoju choroby przyczynia się subkliniczny proces zapalny toczący się u kobiety ciężarnej, który często towarzyszy przedwczesnemu urodzeniu. Po urodzeniu bardzo ważny jest rodzaj podjętej resuscytacji, bowiem narażenie wcześniaka na wspomaganie oddychania za pomocą wentylacji mechanicznej, która może uszkodzić niedojrzałe struktury płuc, jest obok niskiego wieku ciążowego podstawową przyczyną BPD.

Rozpoznanie BPD u noworodków urodzonych przedwcześnie stanowi istotny problem diagnostyczny, gdyż kryteria kliniczne zmieniają się w zależności od sposobów leczenia, a w diagnostyce laboratoryjnej nie ma miarodajnych wykładników biochemicznych służących do potwierdzenia BPD. Natomiast zmiany w płucach rejestrowane za pomocą technik obrazowych jak rtg kłp i USG płuc są często niejednoznacznie interpretowane. W diagnostyce różnicowej BPD należy brać pod uwagę inne częste przyczyny niewydolności oddechowej u wcześniaków jak: wady wrodzone, zakażenia wewnątrzmaciczne i okołoporodowe, zaburzenia nerwowo-mięśniowe, zapalenia płuc i niewydolność krążenia.

Postawienie precyzyjnego rozpoznania, które pozwoli na podejmowanie właściwych działań diagnostyczno-leczniczych i profilaktycznych w zależności od stadium strukturalnej i czynnościowej dojrzałości tkanki płucnej oraz możliwość oceny procesów naprawczych na zastosowane leczenie w oparciu o nowoczesne metody diagnostyczne, powinno prowadzić do znormalizowania struktury i funkcji płuc u wcześniaków z BPD.

Przedstawiona mi do oceny praca doktorska mgr Magdaleny Kołodziej pt. „Wykorzystanie technik biomedycznego obrazowania molekularnego w modelu zwierzęcym dysplazji oskrzelowo-płucnej” dotyczy istotnego zagadnienia, tj. poszukiwania i wykorzystania nowych metod diagnostycznych jaką jest spektroskopia w podczerwieni z transformacją Fouriera w ocenie ekspresji fenotypowej zmian w tkance płucnej w modelu zwierzęcym dysplazji oskrzelowo-płucnej. Jak podkreśla Autorka z uwagi na łatwość z jaką można

wykonać precyzyjne badanie niewielkich próbek tkanek, badana metoda spektroskopia FTIR może być cenna jako wskaźnik diagnostyczny i prognostyczny, szczególnie w przypadku braku tzw. „złotego standardu diagnostycznego”.

Oprawiony wolumin komputerowo wydrukowanej pracy przedłożony mi do recenzji liczy 119 ponumerowanych strony tekstu, ilustrowanego 11 tabelami, 19 rycinami i 30 wykresami, zawiera wykaz skrótów użytych w pracy, streszczenie w języku polskim i angielskim, spis piśmiennictwa liczący 197 polskiej i anglojęzycznej literatury fachowej oraz spis rycin i wykresów. Typowy układ redakcyjny zachowuje proporcje objętościowe rozdziałów.

We wstępie na podstawie bogatego piśmiennictwa Autorka przedstawiła etapy rozwoju płuc, omówiła szeroko problem dysplazji oskrzelowo-płucnej z uwzględnieniem rysu historycznego i ewolucję zmian w definicji w zależności od stosowanych metod leczniczych, przedstawiła epidemiologię i czynniki ryzyka wystąpienia BPD. W odrębnym podrozdziale omówiła szeroko patogenezę i patofizjologię choroby zwracając szczególną uwagę na mechanizm związany z wysokim użyciem tlenu, uszkodzenia związane z agresywną wentylacją i rolę procesów zapalnych w patogenezie dysplazji oskrzelowo-płucnej.

W rozdziale 3 pt. „Spektroskopia w podczerwieni – podstawy metody” Doktorantka przedstawiła szczegółowo zasady obrazowania spektroskopowego w podczerwieni z transformacją Fouriera, która jest obecnie intensywnie rozwijającą się metodą mogącą znaleźć zastosowanie w diagnostyce medycznej. Autorka podkreśla, że każdą zmianę morfologiczną w komórkach i tkankach będącą przejawem choroby poprzedza zmiana chemiczna, która może być wykryta z zastosowaniem metod spektroskopii FTIR. Zdaniem Doktorantki zastosowanie odpowiednio dobranej analizy spektralnej wraz z możliwością dokładnej lokalizacji struktur komórkowych i tkankowych umożliwia zarówno badanie zmian zachodzących w tych strukturach, jaki i diagnozowanie oraz monitorowanie leczenia wielu stanów patologicznych.

Rozdziały wstępu stanowią dobry punkt odniesienia do sformułowania celu pracy, który został sformułowany jasno i precyzyjnie w rozdziale 4 dysertacji.

Za cel pracy Doktorantka postawiła sobie analizę zmian tkanek płuc w modelu zwierzęcym dysplazji oskrzelowo-płucnej oraz porównanie uzyskanych wyników ze zdrową kontrolą. Autorka założyła realizację celu pracy w następujących 2 etapach:

1. Zbadanie różnic molekularnych możliwych do rejestracji za pomocą mikrospektroskopii FTIR w modelu zwierzęcym dysplazji oskrzelowo-płucnej
2. Zbadanie różnic morfometrycznych w pęcherzykach płucnych występujących między populacją zdrową a populacją z objawami BPD

W rozdziale 5 pracy doktorskiej, pt: „Materiał i metody” Autorka na wstępie charakteryzuje materiał badawczy użyty do eksperymentu, w którym wykorzystano myszy model dysplazji oskrzelowo-płucnej. Na wykonanie eksperymentu, który został przeprowadzony w Hudson Institute of Medical Research, Monash University w Melbourne, Australia Doktorantka uzyskała zgodę Komisji Bioetycznej. Ciężarne myszy typu dzikiego otrzymały w 14 dniu ciąży jednorazowo 150 mg lipopolisacharydów na kg masy ciała w celu wywołania okołoporodowego stanu zapalnego. Następnie urodzone w terminie noworodki mysie losowo umieszczono w 2 środowiskach różniących się stężeniem tlenu, tj.: w środowisku normoksemicznym (21% tlenu) i w środowisku hiperoksyjnym (65%) tlenu tworząc w ten sposób 2 grupy badane. W 28 dniu życia zwierzęta humanitarnie uśmiercono, a następnie wykonano preparaty histologiczne tkanki płucnej badanych zwierząt według standardowych procedur.

Do badań mikroskopowych oraz spektroskopowych wykorzystano różnej grubości skrawki płuc badanych myszy. Do badań morfometrycznych skrawki tkanki płucnej barwiono hematoksyliną i eozyną, a następnie na barwionych preparatach wyznaczano obszary odpowiadające ścianom oskrzeli i pęcherzykom płucnym. W wyznaczonych obszarach Doktorantka oceniała zmiany w oskrzelach oraz pęcherzykach płucnych badanych myszy obrazowaniem mikrospektroskopowym FTIR. Po wstępnym przetworzeniu map chemicznych ocenianych struktur, Autorka opisała uzyskane widma pod kątem występujących w nich charakterystycznych pasm. W kolejnym etapie procesu badawczego Autorka obliczyła współczynniki absorpcji i poddała widma analizie PCA.

Wyniki zebranych danych, tj. parametry histopatologiczne, współczynniki absorpcji dla oskrzeli, komponenty podstawowe dla oskrzeli, współczynniki absorpcji dla pęcherzyków. Autorka scharakteryzowała za pomocą podstawowych charakterystyk statystycznych, tj. średniej, mediany minimum, maximum i odchylenia standardowego i poddała adekwatnej analizie statystycznej. Do sprawdzenia normalności rozkładu zastosowała test Shapiro-Wilka. Następnie dla sprawdzenia istotności różnic między grupami zastosowała test parametryczny t-studenta dla rozkładów normalnych i test nieparametryczny Wilcoxon dla cech zmiennych nie spełniających kryterium normalności rozkładu. $P < 0,05$ przyjęła za istotne statystycznie.

W przedstawionej mi do oceny pracy w Rozdziale 5, tj. „Materiał i Metody” nie ma odrębnego podrozdziału, w którym Doktorantka powinna opisać zastosowane w pracy metody statystyczne. Metody te są wspomniane w kolejnych podrozdziałach rozdziału 6, pt. „Wyniki”, przy omawianiu uzyskanych wyników przeprowadzonych badań. Wyniki badań statystycznych Doktorantka opisała w tekście i przedstawiła czytelnie w postaci 11 tabel i na 30 wykresach.

Należy podkreślić, że badania zaplanowane i wykonane przez Doktorantkę są unikatowe na skalę światową i mogą przyczynić się do upowszechnienia zastosowanej przez nią metody mikrospektroskopii w podczerwieni FTIR w diagnostyce zmian molekularnych w płucach w dysplazji oskrzelowo-płucnej u wcześniaków. Jak podkreśla Autorka, postęp techniczny w obrazowaniu zapewnia coraz bardziej szczegółowy wgląd w procesy molekularne tkanki płucnej, co może służyć do opracowania szybkiego i wiarygodnego testu pozwalającego na określenie zarówno dojrzałości tkanki płucnej jak też jej reakcji na zastosowaną terapię. Spostrzeżenia te umożliwią rozwój nowoczesnych strategii leczniczych mających na celu hamowanie destrukcji tkanki płucnej i promowanie rozwoju procesów naprawczych płuc u wcześniaków z BPD. Należy mieć nadzieję, że wyniki wyżej wymienionych badań w przyszłości będą miały bardzo istotny aspekt praktyczny dla lekarzy neonatologów, gdyż przyczynią się do rozwoju nowoczesnych procedur diagnostyczno-leczniczych, które poprawią rokowanie dotyczące zdrowia i życia w grupach najmłodszych wcześniaków narażonych na rozwój BPD.

Oceniając pracę bardzo pozytywnie, a szczególnie zaangażowanie Autorki w zaplanowanie i wykonanie bardzo trudnego eksperymentu prowadzącego do

uzyskania preparatów histologicznych tkanki płucnej noworodków mysich, w indukowanym modelu dysplazji oskrzelowo-płucnej, a następnie przeprowadzenie badań molekularnych oraz ich opracowanie należy stwierdzić, że wykonana praca laboratoryjna zasługuje na najwyższe uznanie. Natomiast mam uwagę do tytułu pracy, który sugeruje, że Doktorantka badała wykorzystanie wielu technik biomedycznego obrazowania w modelu zwierzęcym dysplazji oskrzelowo-płucnej, podczas gdy była to jedna metoda, tj. mikrospektroskopia w podczerwieni FTIR. W związku z tym uważam, że nazwa metody powinna się znaleźć w tytule pracy, tj. np.: *„Wykorzystanie mikrospektroskopii w podczerwieni FTIR w obrazowaniu molekularnym zwierzęcego modelu dysplazji oskrzelowo-płucnej”*.

Na podstawie przeprowadzonych badań Autorka wysunęła 5 wniosków, które jednak nie wszystkie odpowiadają celom pracy postawionym przez Doktorantkę. Za najważniejsze z nich należy uznać te, które stwierdzają, że mikrospektroskopia w podczerwieni FTIR w BPD jest czułym narzędziem wykazującym wysoką zgodność otrzymanych wyników z metodami morfometrycznymi – wniosek 1 i 2. Natomiast Doktorantka nie uwzględniła we wnioskach stwierdzonych w badaniach własnych różnic molekularnych, jakie są możliwe do rejestracji za pomocą mikrospektroskopii FTIR w modelu zwierzęcym dysplazji oskrzelowo-płucnej oraz nie przedstawiła jakie różnice morfometryczne występują w pęcherzykach płucnych między populacją zdrową a populacją z BPD, a takie właśnie były główne cele pracy przedstawione przez Autorkę w rozdziale 4, pt. „Cel pracy” dysertacji doktorskiej. Również wniosek 4 nie wynika bezpośrednio z przeprowadzonych badań, a konieczność przeprowadzenia kolejnych badań w indukowanym modelu dysplazji oskrzelowo-płucnej u myszy z wykorzystaniem metod komplementarnych należało ewentualnie uwzględnić i omówić w dyskusji.

W rozdziale 7 pt. „Dyskusja” Autorka podejmuje udaną próbę interpretacji własnych badań w konfrontacji z rezultatami zbliżonych tematycznie badań innych autorów. Należy podkreślić, że do chwili obecnej tylko nieliczne zespoły badawcze na świecie wykorzystywały mikrospektroskopię FTIR w celach diagnostycznych u wcześniaków z BPD. Przytaczając prace innych autorów Doktorantka podkreśla, że spektroskopia FTIR może mieć również zastosowanie w badaniach dotyczących patogenezy i remodelingu płuc, co

wykazała w swoich nowatorskich badaniach. Według Doktorantki wiedza ta jest niezbędna do dalszego rozwoju metod profilaktycznych i leczniczych w dysplazji oskrzelowo-płucnej u wcześniaków. Dyskusja wyników badań dowodzi dużej wiedzy Autorki w zakresie prowadzonych dociekań naukowych i jest napisana przejrzysto i czytelnie.

Praca jest napisana w sposób komunikatywny, a uzyskane przez Autorke wyniki budzą zainteresowanie ze względu na ich nowatorski charakter. Na szczególną uwagę zasługuje strona graficzna pracy, która w sposób przejrzysty prezentuje wyniki badań. Z obowiązku recenzenta przedstawiam drobne uchybienia edytorskie stwierdzone w przedłożonej mi do recenzji pracy, tj. po tytule recenzowanej pracy Autorka postawiła kropkę, natomiast według poradni językowej PWN i według ogólnie przyjętych zasad w tytule i nagłówkach kropek nie stawia się.

Na stronie 9 dysertacji Doktorantka pisze, cyt.: „...podział ciężkości przewlekłego uszkodzenia płuc u niemowląt suplementowanych tlenem powyżej 28 dni od urodzenia w zależności od *kumulatywnego* czasu trwania suplementacji tlenem...” wydaje się, że zamiast *kumulatywnego* wystarczyło użyć polskiego słowa, tzn. „*łącnego* czasu trwania suplementacji tlenem...” co byłoby bardziej zrozumiałe dla czytelnika. W tym samym zdaniu jest pomyłka merytoryczna gdyż ciężkość przewlekłego uszkodzenia płuc poza łącznym czasem suplementacji tlenem, zależy również od stężenia podawanego tlenu wymaganego po 36 tygodniach wieku postmenstrualnego, a nie tak jak pisze Autorka po 36 tygodniach wieku korygowanego. Wynika to z faktu, że określenia: wiek postmenstruacyjny i wiek korygowany mają zupełnie inne znaczenie. Wiek postmenstruacyjny jest to wiek płodu lub wcześniaka liczony według reguły Naegelego, tj. od ostatniej miesiączki w cyklu, natomiast wiek korygowany jest to wiek kalendarzowy wcześniaka w tygodniach pomniejszony o liczbę tygodni brakujących do porodu w terminie, tj. w 40 tygodniu ciąży.

Ponad to proponuję, by znajdujący się w pracy wykaz skrótów był ułożony według alfabetu, co znacznie ułatwia szukanie znaczenia skrótów użytych w tekście. Kolejna moja uwaga dotyczy braku w przedłożonej mi do oceny pracy odrębnego rozdziału dotyczącego zastosowanych przez Doktorantkę metod statystycznych.

W rozdziale 9 pt. „Bibliografia” umieszczono 197 pozycji literatury z czego większość (188) to prace anglojęzyczne; 90 cytowanych prac jest z ostatnich 5 lat. W tekście pracy na stronie 11 kolejność cytowanych prac jest nieprawidłowa, gdyż po pozycji nr 17, są cytowane prace nr 24 i 25, a następnie 19, 26-31, natomiast nie zacytowano pozycji piśmiennictwa nr 18.

Sumując moje spostrzeżenia i refleksje poczynione w trakcie lektury rozprawy doktorskiej pt.: „Wykorzystanie technik biomedycznego obrazowania molekularnego w modelu zwierzęcym dysplazji oskrzelowo-płucnej” stwierdzam, że spełnia ona kryteria stawiane rozprawom doktorskim i przedstawiam Wysokiej Radzie Naukowej Kolegium Nauk Medycznych Uniwersytetu Rzeszowskiego wniosek o dopuszczenie jej Autorki mgr Magdaleny Kołodziej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.