UNIWERSYTET MEDYCZNY IM. KAROLA MARCINKOWSKIEGO W POZNANIU

KATEDRA I KLINIKA ORTOPEDII I TRAUMATOLOGII
ul. 28 Czerwca 1956r. 135/147 tel. 061 83 10 164
61-545 Poznań
e-mail: ko3t@orsk.ump.edu.pl

Kierownik Katedry i Kliniki Ortopedii i Traumatologii
Prof. dr hab. n. med. Jacek Kruczyński

Poznań, dnia 05.08.2022r.

dr hab. Łukasz Łapaj
Klinika Ortopedii Ogólnej,
Onkologicznej i Traumatologii
Uniwersytet Medyczny w Poznaniu

Ocena rozprawy na stopień doktora w dziedzinie nauk medycznych lek. Dawida Packa pt. *„Analiza jakościowa i ilościowa lipidowych markerów stanu zapalnego w surowicy pacjentów po operacjach protezoplastyki stawu biodrowego"*

Promotor prof. dr hab. Izabela Gutowska;
Promotor pomocniczy : dr n. med. Dominika Maciejewska - Markiewicz

Przedstawiona do oceny dysertacja ma klasyczny układ monografii, obejmuje sześć zasadniczych rozdziałów, spis piśmiennictwa, tabel i rysunków łącznie na 82 stronach. Przeprowadzone przez doktoranta badania oparte były o próbki materiału pobranego od pacjentów na co autor uzyskał odpowiednią zgodę zarówno Komisji Bioetycznej Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie, jak i włączonych do badania pacjentów. Rozprawa mieści się w ramach szeroko pojętych badań nad patogenezą choroby zwyrodnieniowej stawów.

**Trafność podjętej problematyki badawczej i jej oryginalność** Choroba zwyrodnieniowa stawów to jedna z najczęstszych przyczyn niepełnosprawności osób dorosłych, zwłaszcza starszych, w krajach rozwiniętych. Dotyczy ona w głównej mierze osób po 60 roku życia, zwykle w obrębie dużych stawów przenoszących obciążenia - biodrowego i kolanowego. Klasycznie wyróżnia się pierwotną chorobę zwyrodnieniową, określaną także jako idiopatyczną; mechanizm jej powstawania nie został dobrze poznany i w świetle współczesnych badań wydaje się że jest on wieloczynnikowy. Z kolei wtórną chorobę zwyrodnieniową rozpoznaje się w sytuacjach w których możliwe jest określenie przyczyny prowadzącej do destrukcji stawu, najczęściej w wyniku zaburzenia zborności powierzchni stawowych (dyskongruencja), niestabilności danego stawu, lub jego mechanicznego przeciążania.

Z uwagi na słabo poznaną patogenezę choroby zwyrodnieniowej w chwili obecnej brak jest leczenia przyczynowego, nie ma także skutecznej terapii o charakterze farmakologicznym, wobec czego u dużej liczby pacjentów konieczne jest wdrożenie leczenia operacyjnego, co stanowi bardzo duże obciążenie dla pacjenta i jest wyzwaniem finansowym i organizacyjnym dla systemu opieki zdrowotnej.

Obecnie w wielu krajach prowadzi się intensywne badania mające na celu ustalenie najistotniejszych szlaków metabolicznych uczestniczących w patogenezie procesu zwyrodnieniowego. Stwarza to nadzieję na opracowanie terapii pozwalających na zatrzymanie, lub chociaż spowolnienie progresji choroby. Zachęca do tego spektakularny sukces terapii biologicznych wprowadzanych w ostatnich latach do leczenia szeregu chorób reumatycznych. Niestety, podjęte dotychczas próby takiego postępowania w chorobie zwyrodnieniowej, między innymi terapie blokujące szlaki z udziałem interleukiny-1, nie przyniosły spodziewanych

korzyści. Niewątpliwie dla opracowania skutecznej terapii konieczne jest lepsze poznanie skomplikowanej sieci powiązań między poszczególnymi mediatorami uczestniczącymi w tym procesie. Jedną z grup substancji odgrywających istotną rolę w rozwoju choroby są związki pochodzenia lipidowego; w minionych latach większość badań skupiała się na dwóch grupach takich związków – leukotrienach i tromboksanach. W omawianej pracy doktorant skupił się również na lipidowych markerach stanu zapalnego, w tym szczególnie na pochodnych kwasu hydroksyeikozatetraenowego (HETE), hydroksyoktadekadienowego (HODE), oraz hydroksyeikozapentaenowego (HEPE).

**Uwagi**. Omawiana tematyka pracy wpisuje się w światowy nurt aktualnie prowadzonych badań dotyczących patogenezy choroby zwyrodnieniowej stawów, jest ona interesująca z punktu widzenia naukowego i merytorycznie uzasadniona. Ze względu na wysoką zapadalność na chorobę zwyrodnieniową temat pracy jest istotny dla praktyki klinicznej.

**Wstęp** pracy został podzielony na szczęść głównych części. Doktorant rozpoczął go od podania definicji pierwotnej i wtórnej choroby zwyrodnieniowej, przedstawił dane dotyczące jej epidemiologii, ze szczególnym uwzględnieniem stawu biodrowego. Następnie przedstawiono zarys patogenezy choroby zwyrodnieniowej. Autor opisał po krótce szlaki metaboliczne z udziałem cytokin prozapalnych, oraz przedstawił główne aspekty procesów degeneracyjnych w obrębie chondrocytów. W kolejnych częściach omówiono szereg przyczyn wtórnej choroby zwyrodnieniowej stawu biodrowego – doktorant jako przykłady ilustrujące ten proces dobrał konflikt udowo – panewkowy, rozwojową dysplazję stawu biodrowego, oraz przeciążenia mechaniczne. W kolejnej części po krótce opisane zostały aspekty genetyczne patogenezy artroz. Później doktorant skupił się na leczeniu choroby zwyrodnieniowej stawu biodrowego, przedstawiając dostępne współcześnie metody postępowania nieoperacyjnego. Szczegółowo omówione zostały sposoby leczenia farmakologicznego, oraz niefarmakologicznego – takie jak wykorzystanie odpowiedniej aktywności fizycznej i postępowanie dietetyczne. Później przedstawiono sposoby postępowania chirurgicznego, uwypuklając rolę endoprotezoplastyki całkowitej stawu biodrowego. W ostatniej części wstępu doktorant przedstawił krótką charakterystykę metaboliczną wielonienasyconych kwasów tłuszczowych z rodziny omega-3 i omega-6 oraz ich pochodnych. Opisane zostały szlaki syntezy poszczególnych mediatorów lipidowych, podana została krótka charakterystyka ich roli biologicznej.

**Uwagi**. Wstęp ma relatywnie dużą objętość w porównaniu z całą rozprawą, co jest jednak zrozumiałe ze względu na skomplikowaną patogenezę choroby zwyrodnieniowej. Szkoda że przy konstruowaniu rozdziału autor nie korzystał z definicji i algorytmów leczenia opracowanych przez OARSI – pozwoliłoby to na skrócenie i uproszczenie tej części. Autor starał się ułożyć poszczególne podrozdziały w sposób logiczny, choć zabrakło tu konsekwencji - wydaje się iż omawianie czynników genetycznych istotnych w chorobie idiopatycznej powinno poprzedzić opisanie czynników mechanicznych dominujących w artrozach wtórnych. Informacje dotyczące roli mediatorów lipidowych w patogenezie artrozy są bardzo ogólnikowe, choć w mojej ocenie nie jest to istotną wadą gdyż dużą dawkę merytorycznej wiedzy na ich temat zawarto w dyskusji co bardzo istotnie ułatwia jej zrozumienie. We wstępie brakuje natomiast informacji na temat zaburzeń mineralnych kości związanych z chorobą zwyrodnieniową – jest to jeden z istotnych aspektów pracy. Jako reprezentant ośrodka Poznańskiego wywodzącego z dorobku Profesora Wiktora Degi nie mogę zostać obojętny wobec niektórych określeń zastosowanych we wstępie. Pragnę podkreślić iż prawidłowe polskie określenie „dysplazji stawu biodrowego" to rozwojowa dysplazja stawu biodrowego i

w jej patogenezie nie uczestniczą urazy, co sugeruje doktorant na stronie 12. Chciałbym również zaznaczyć, że we współczesnej ortopedii określenie „leczenie zachowawcze" jest niezwykle niefortunne i zdecydowanie lepszym jest określenie „leczenie nieoperacyjne".

**Cele pracy**. W tej części rozprawy doktorant najpierw umieścił krótką preambułę, następnie przedstawił główną hipotezę badawczą, oraz cel główny i trzy cele szczegółowe. Obejmują one ocenę profilu mediatorów lipidowych w osoczu w zależności od zaawansowania choroby zwyrodnieniowej, indeksu masy ciała, a także charakterystykę wybranych mikro- i makroelementów w kości udowej b.

**Uwagi**. W mojej ocenie sposób sformułowania głównego celu pracy i jej tytułu to największa jej słabość. Jednoznacznie wskazują one, iż po przeprowadzeniu zabiegu endoprotezoplastyki oceniane były poszczególne mediatory w osoczu i pierwiastki w kości. Technicznie rzecz ująwszy tak też zapewne było, przy czym oznaczenia te odzwierciedlały stan metaboliczny odpowiadający zaawansowanemu procesowi zwyrodnieniowemu. Natomiast z punktu widzenia klinicysty takie sformułowanie tytułu i celu głównego jednoznacznie wskazuje że oceniany będzie wpływ przeprowadzonej wcześniej operacji na badane parametry. Wydaje się że proste zamienienie słów „po operacjach protezoplastyki" na „z zaawansowaną chorobą zwyrodnieniową" istotnie zwiększyłoby spójność tytułu i celów pracy z jej zawartością. Cele szczegółowe w swym zapisie zostały niejako „skażone grzechem pierworodnym" brzmienia celu głównego. Tym niemniej z punktu widzenia naukowego zostały sformułowane poprawnie i mają uzasadnienie w dalszej części manuskryptu.

**Metodologia**. Ten rozdział doktorant zaczął od podania planu badania, do którego włączono grupę 74 pacjentów. Doktorant przedstawił kryterium włączenia – obecność pierwotnej choroby zwyrodnieniowej u pacjentów zakwalifikowanych do endoprotezoplastyki tego stawu, przy czym jako kryterium wykluczenia przyjęto obecność patologii prowadzących do wtórnej choroby zwyrodnieniowej. Nasilenie samego procesu zwyrodnieniowego autor oceniał na podstawie analizy radiogramów z zastosowaniem skali Tonnisa. Przed endoprotezoplastyką od pacjentów pobierano krew dla przeprowadzenia rutynowych badań laboratoryjnych. Z tego materiału uzyskiwano próbkę surowicy, która po odpowiednim przygotowaniu (ekstrakcja fazy stałej) poddawana była analizie z zastosowaniem wysokosprawnego chromatografu cieczowego z detektorem DAD pracującym w zakresach promieniowania ultrafioletowego. Na początku podrozdziału opisującego analizę HPLC podano dokładną listę związków których stężenia w próbce były oceniane. Następnie podczas zabiegów autor pobierał próbki kości gąbczastej z głów kości udowych. Próbki te po odpowiedniej obróbce (obejmującej trawienie w kwasie azotowym) poddawane były analizie z zastosowaniem optycznej spektrometrii emisyjnej z plazmą indukcyjnie sprzężoną. Doktorant dokładnie opisał stosowane w trakcie tego badania wzorce kalibracyjne, oraz przyjęte do analizy długości fal. Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej, przy czym autor dokładnie opisał algorytm jej prowadzenia, wskazał stosowane testy.

**Uwagi**. Przejęte metody badawcze nie budzą zastrzeżeń i są adekwatne do założonych celów. Grupa badana jest wystarczająco duża by umożliwić przeprowadzenie dobrej analizy statystycznej, a metodyka opisana jest prawidłowo, przy czym mam tu dwa drobne zastrzeżenia. Opis badania z wykorzystaniem HPLC nie wskazuje wersji wykorzystywanego oprogramowania, ponadto autor nie wspomniał czy na etapie preparatyki SPE próbka była rozcieńczana (miała ona niewielką objętość przed badaniem). Z kolei opisie badań dotyczących składu mineralnego brak jest informacji na temat tego, jak przeliczano stężenia – czy podane wartości dotyczą tkanki suchej, czy miękkiej. Uwzględniając niewielką ilość użytego kwasu azotowego można przyjąć że próbki były dość małe (przypuszczam że w stanie wilgotnym

ważyły mniej niż 100-200 miligramów). Brak jest informacji jak były ważone, oraz czy przed trawieniem poddano je np. procesowi delipidacji. Mając na uwadze że zgodnie z opisaną metodyką dokonano istotnego rozcieńczania płynu zawierającego strawioną tkankę przed wykonaniem właściwych pomiarów, potencjalne błędy na początkowym etapie mogą istotnie przełożyć się na ostateczny wynik. Wątpliwości budzi także mało precyzyjny opis kryteriów włączenia i wyłączenia. Na podstawie lektury tej części rozprawy nie jest na przykład jasne czy do badania włączani byli pacjenci z chorobą zwyrodnieniową innych stawów – na przykład kolanowych, albo zaburzeniami lipidowymi. Należy zwrócić uwagę że praca nie obejmuje grupy kontrolnej lub porównawczej; włączenie takiej grupy podniosłoby wartość uzyskanych wyników dotyczących stężenia markerów lipidowych, natomiast z oczywistych względów bioetycznych nie byłoby możliwe uzyskanie próbek kości do badań zawartości mikro- i makroelementów.

**Wyniki**. Rezultaty badań przedstawiono w osobnym rozdziale podzielonym na 10 podrozdziałów, co ułatwia analizę tej części. Wyniki przedstawiono w 10 tabelach, w których bardzo klarownie zaznaczono najistotniejsze informacje. Autor przedstawił najpierw wyniki badań laboratoryjnych w całej grupie pacjentów. Ponieważ u włączonych pacjentów stwierdzono występowanie zmian zwyrodnieniowych o nasileniu 2 oraz 3 w skali Tonnisa dalsze analizy dotyczące wpływu zaawansowania choroby zwyrodnieniowej na badane parametry obejmowały ocenę występowania różnic między tymi grupami. W ocenianej pracy nie stwierdzono istotnej różnicy między wiekiem pacjentów, BMI, oraz wynikami badań laboratoryjnych u pacjentów z różnym nasileniem procesu zwyrodnieniowego. Analiza dotycząca stężenia eikozanoidów w osoczu wykazała, iż między grupami z różnym nasileniem procesu zwyrodnieniowego występowały różnice pomiędzy stężeniami 18-HEPE, 9-HODE, 17-MDHA, 5-HETE, 5-okso-ETE. Analiza stężenia pierwiastków w kości gąbczastej głowy kości udowej wykazała, iż u osób z bardziej zaawansowanym procesem zwyrodnieniowym istotnie obniżała się zawartość wapnia, strontu, fosforu i litu. Następnie doktorant przeanalizował zależność między BMI a badanymi w pracy parametrami; przyjął przy tym podział na dwie grupy – osób z prawidłowym BMI oraz BMI > 25. Analiza porównawcza wyników standardowych badań laboratoryjnych wykazała, że osoby z prawidłową masą ciała miały istotnie wyższą ilość płytek krwi, pozostałe parametry były zbliżone. Z kolei porównanie stężenia markerów lipidowych w surowicy wykazało istotne różnice pomiędzy stężeniami Resolwiny E1 i D1, Leukotrienu A4, na granicy istotności statystycznej znajdowała się różnica stężeń Prostaglandyny E2. Nie stwierdzono natomiast istotnych statystycznie różnic między stężeniem mikro- i makroelementów w kości gąbczastej głów kości udowych w obu grupach pacjentów. W ostatniej części rozdziału doktorant przeprowadził analizę statystyczną dotyczącą korelacji badanych parametrów między sobą. Wprawdzie autor zaobserwował pewne tendencje dotyczące zależności między poszczególnymi parametrami, jednakże nie były to zależności silne.

**Uwagi**. Rozdział ten jest napisany przejrzyście i prawidłowo przedstawia uzyskane wyniki. Niestety nigdzie w tej części pracy nie udało mi się znaleźć informacji dotyczącej wielkości grup przy uwzględnieniu podziału na osoby z prawidłowym i podwyższonym BMI – dane te zawarte są dopiero w dyskusji co utrudnia analizę wyników. Wprawdzie tabele zawierają najistotniejsze dane statystyczne, jednak w mojej ocenie przydatne byłoby umieszczenie w formie wykresów informacji o rozkładzie wartości niektórych parametrów, np. BMI czy stężeniach poszczególnych mediatorów i pierwiastków.

**Dyskusja**. W rozdziale doktorant omawia wyniki zrealizowanych badań porównując je z danymi przedstawionymi przez innych autorów. W pierwszej części dyskusji podsumowane

zostały najistotniejsze informacje dotyczące patogenezy choroby zwyrodnieniowej i streszczono uzyskane wyniki. Następnie bardziej szczegółowo omówione zostały zależności między poziomem mediatorów lipidowych a nasileniem choroby zwyrodnieniowej. W części tej przedstawiono także dokładniejszą charakterystykę badanych mediatorów co znacznie ułatwia jej zrozumienie. Z kolei omówiono zależność między indeksem masy ciała a obserwowanym stężeniem mediatorów lipidowych, analizując wyniki w kontekście patogenezy procesu zapalnego jak i danymch z literatury. W ostatniej części dyskusji podsumowano obserwowane zmiany struktury pierwiastkowej kości gąbczastej głowy kości udowej i omówiono rolę w tym procesie mediatorów lipidowych.

**Uwagi**. Dyskusja napisana jest w sposób wskazujący na dobrą znajomość omawianych zagadnień. Autor wykazał się umiejętnością krytycznej analizy uzyskanych wyników w kontekście prac innych autorów; zauważyć należy uwzględnienie w dyskusji faktu jednoczesnego wydzielania w procesie zapalnym mediatorów zarówno pro- jaki przeciwzapalnych. W mojej ocenie w dyskusji brakuje choćby krótkiego omówienia ograniczeń pracy, takich jak brak grupy kontrolnej, czy subiektywnego charakteru oceny radiologicznej.

**Wnioski**. Doktorat podsumowuje uzyskane wyniki w formie pięciu wniosków szczegółowych. W pierwszym autor wskazuje iż osoby z zaawansowaną chorobą zwyrodnieniową stawu biodrowego charakteryzowali się bardziej nasilonym stanem zapalnym związanym z produkcją lipidowych mediatorów stanu zapalnego, następnie wnioskuje że większy stopień zaawansowania choroby wiązał się z większą ilością tych markerów co wskazuje na zwiększone ryzyko narażenia na stan zapalny. W kolejnych punktach autor wskazuje na fakt iż osoby z większym BMI są bardziej narażeni na rozwój stanu zapalnego, oraz charakteryzują się zmniejszoną ilością wapnia i fosforu w tkance kostnej. W ostatnim punkcie wskazano na utratę mineralnych składników tkanki kostnej u osób z bardziej zaawansowanym procesem zwyrodnieniowym.

**Uwagi**. Przedstawione wnioski jako całość odpowiadają postawionym przez doktoranta celom, przy czym sposób ich przedstawienia mógłby być bardziej precyzyjny. Uważam że pierwszy i dugi wniosek można z powodzeniem połączyć. Byłbym także ostrożniejszy w stawianiu tezy, że większe nasilenie choroby zwyrodnieniowej bądź wyższe BMI zwiększa ryzyko narażenia pacjenta na rozwój zapalenia. Takie sformułowania mogą sugerować że artroza biodra zwiększa np. ryzyko zapalnych chorób jelit. Z kolei ostatni wniosek sugeruje, że zaawansowana choroba zwyrodnieniowa powoduje ogólną utratę elementów mineralnych tkanki kostnej, podczas gdy stwierdzona była utrata lokalna. Muszę przyznać, iż z ogromnym zainteresowaniem przeczytałem treść wniosku czwartego. Ku mojemu zaskoczeniu doktorant, doświadczony operator, pobierał od każdego pacjenta próbkę głowy kości udowej i na podstawie jej badania uzyskał dane pozwalające wyciągać wnioski dotyczące zawartości badanych pierwiastków w kości biodrowej. Niezbicie wskazuje to, że nie zrozumiałem niezwykle nowatorskiej metodyki badań, albo (co wydaje się jednak mało prawdopodobne) doktorant fatalnie przejęzyczył się w tym zdaniu i na kolejnych etapach nikt nie zauważył tego błędu. Liczę że w trakcie publicznej obrony moje wątpliwości w tym względzie zostaną rozwiane.

**Piśmiennictwo**. W tekście rozprawy doktorant odnosi się do ponad 170 odniesień literaturowych. Zwraca uwagę fakt, iż większość cytowanych prac to doniesienia z ostatnich lat, co bardzo dobrze świadczy o przygotowaniu autora. Z przyjemnością muszę odnotować iż doktorant cytuje również prace pochodzące z Polski, w tym z ośrodka który mam przyjemność reprezentować.

**Uwagi**. Piśmiennictwo dobrane zostało prawidłowo, obejmuje głównie prace z ostatnich lat. Układ tej części sugeruje, iż została ona wygenerowana z zastosowaniem odpowiedniego oprogramowania. Niestety w konsekwencji pojawiło się kilka błędów – między innymi miesiące podawane są po polsku w mianowniku, a według Słownika Języka Polskiego prawidłowym jest podawanie ich w dopełniaczu. Oprócz tego pojawiło się kilka niezbyt zręcznych zapisów wynikających prawdopodobnie z błędów metadanych stosowanego oprogramowania.

**Z obowiązku recenzenta** muszę zaznaczyć, że praca została napisana poprawnie pod względem formalnym i językowym, przy czym nie jestem zwolennikiem stosowania w tego typu opracowaniach określenia „rysunek", uważam że „rycina" byłaby bardziej na miejscu. Muszę też dodać, że autorowi zdarzyły się potknięcia gramatyczne (choćby na stronie tytułowej) oraz stylistyczne – na stronie 10 wspomina że FAI to konflikt zaczepów, zaś na stronie 42 podaje iż „sód klasyfikował się na granicy istotności statystycznej". Niestety niektóre tabele w części dotyczącej wyników są nieprawidłowo sformatowane i nie mieszczą się na jednej stronie, zaś tabela na stronie 34 jest wprawdzie schludna, choć zbyt rozbudowana.

**Podsumowując całokształt pracy** stwierdzam, że rozprawa doktorska lek. Dawida Packa pt. *„Analiza jakościowa i ilościowa lipidowych markerów stanu zapalnego w surowicy pacjentów po operacjach protezoplastyki stawu biodrowego"* została poprawnie opracowana pod względem formalnym i merytorycznym. Praca stanowi samodzielny dorobek autora wartościowy pod względem naukowym i praktycznym. Wspomniane powyżej uwagi nie umniejszają w sposób istotny mojej pozytywnej oceny całości rozprawy.

Uważam, że praca spełnia wszelkie wymogi stawiane rozprawom doktorskim, wobec czego wnoszę do Rady Naukowej Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie o przekazanie jej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Poznań, 05.08.2022

Łukasz Łyszy