

Prof. dr hab. med. Danuta Owczarek

Katedra Gastroenterologii i Hepatologii UJ CM

Kraków, dnia 29.09.2023 r.

OCENA

rozprawy doktorskiej lek. med. Marek Kowalski

pt. „Ocena występowania niedoboru enzymu laktazy u pacjentów z chorobą trzewną”

wykonana na podstawie uchwały Rady Nauk Medycznych Uniwersytetu Medycznego w Łodzi i pisma Prodziekana ds. Nauki Wydziału Lekarskiego z dnia 2.08.2023 r.

Przesłana do oceny rozprawa doktorska lek. Marka Kowalskiego jest oryginalną pracą badawczą i ma charakter monografii. Została wykonana pod opieką naukową Prof. dr hab. n. med. Ewy Mateckiej-Wojcieszko .

Rozprawa liczy 117 stron, zawiera 11 rycin, 5 tabele oraz obejmuje 442 pozycji piśmiennictwa zagranicznego i polskiego. Układ poszczególnych rozdziałów jest typowy dla tego typu opracowania naukowego. Przed wstępem, na stronach 1-2, lek. Marek Kowalski zamieścił spis treści, na stronach 3-5 streszczenie pracy w języku polskim, natomiast na stronach 6-8 w języku angielskim. Alfabetyczny wykaz zastosowanych skrótów autor zamieścił na stronach 116-117, a wykaz tabel i rycin na stronach 114-115.

We wstępie od strony 9 do 13, lek. Marek Kowalski przedstawia objawy choroby trzewnej związane z przewodem pokarmowym, jak również związane z innymi układami, szczególną uwagę zwraca na ryzyko rozwoju nowotworów złośliwych w przypadku nie leczonej choroby trzewnej przez lata. Autor podkreśla również, że u pacjentów z chorobą trzewną często współistnieją inne choroby autoimmunologiczne. Objawy pozajelitowe i choroby towarzyszące, autor dodatkowo przedstawił w tabeli 1, str. 13. Na kolejnych 2 stronach autor przedstawił epidemiologię choroby trzewnej. Na uwagę zasługuje rozdział dotyczący etiopatogenezy, w którym autor bardzo dokładnie przedstawia współdziałanie czynników genetycznych, immunologicznych oraz środowiskowych biorących udział w rozwoju choroby trzewnej, u podstaw której jest patologiczna reakcja układu immunologicznego na gluten oraz pochodne prolamin. W procesie trawienia glutenu oraz białek bogatych w prolaminy, uczestniczą enzymy, których aktywność zależy od poziomu ekspresji kodujących ich genów- co wpływa na przebieg choroby np. obniżony poziom ekspresji genów PREP zlokalizowanych na chromosomie 6q21-22 kodujących oligopeptydazy prolilowe oraz spadku aktywności enzymów, co istotnie wpływa na ciężkość przebiegu choroby trzewnej i zwiększa ryzyko opóźnienia uzyskania remisji pomimo prawidłowego stosowania diety bezglutenowej. W podstawianiu patologicznych reakcji

immunologicznych, odgrywa również znaczącą rolę wzrost przepuszczalności błony śluzowej jelit, umożliwia to przedostawanie się krótkich łańcuchów niestrawionych białek bogatych w prolaminę w całości do błony podśluzowej. Autor analizuje również udział mikrobioty jelitowej w procesie trawienia białek glutenu. Bakterie zarówno jamy ustnej, jak i jelitowe produkują własne endopeptydazy oraz hydrolazy, które przyczyniają się do trawienia łańcuchów białkowych będących produktem rozkładu gliadyny. Deamidowane peptydy gliadyny przyłączane są do receptorów DQ2 lub DQ8 obecnych na komórkach prezentujących antygen, fragmenty gliadyny są przyłączane w różne regiony receptora DQ2 lub DQ8, w procesie prezentacji antygeny uczestniczą dwa heterodimery DQ2 (DQ2.2 oraz DQ2.5) oraz DQ8. W wyniku reakcji dochodzi do powstania trwałych kompleksów HLA-DQ2 oraz DQ8 z deamidowanymi fragmentami α -gliadyny. Następnie fragmenty białkowe prezentowane są przez komórki APC limfocytom B, wywołując dalszą odpowiedź humoralną. Reakcje immunologiczne prowadzą do aktywacji komórek uczestniczących w procesach zapalnych, zarówno o charakterze odpowiedzi komórkowej, jak i humoralnej. Dodatkowo, peptydy gliadyny w różnych, złożonych mechanizmach prowadzą do bezpośredniej apoptozy enterocytów oraz pod wpływem gliadyny dochodzi do zwiększonej produkcji czynnika wzrostu EGF, który prowadzi do proliferacji enterocytów w obrębie krypt jelitowych.

Ten skomplikowany mechanizm rozwoju choroby trzewnej, lek. med. Marek Kowalski nie tylko szczegółowo i jasno opisuje, ale również bardzo trafnie przedstawia na rycinie 1 strona 24.

Kolejny rozdział to diagnostyka choroby trzewnej, na stronach 25- 26, autor opisuje zmiany histopatologiczne jakie zachodzą w obrębie błony śluzowej jelita cienkiego, które są objęte klasyfikacją Marsh-Oberhubera. W tabeli 3 strona 27, zostały przedstawione schorzenia inne niż choroba trzewna, w przebiegu których mogą występować podobne zmiany histopatologiczne w błonie śluzowej jelita cienkiego. W kolejnej części tego rozdziału lek. Marek Kowalski, przedstawia kryteria diagnostyczne choroby trzewnej, rozpoczynając od zarysu historycznego, następnie opisuje kryteria diagnostyczne oparte na wykonywaniu badań serologicznych oraz badań genetycznych opartych na oznaczeniu antygenów zgodności tkankowej HLA DQ2/DQ8. Autor trafnie zwraca uwagę na konieczność oznaczania poziomu immunoglobuliny A w procesie diagnostycznym, z uwagi na często występujący niedobór IgA u pacjentów z chorobą trzewną. Brak wykonania tego oznaczenia może skutkować opóźnionym rozpoznaniem choroby trzewnej, w wyniku fałszywie ujemnego badania anty-tGTIgA.

Lek. Marek Kowalski opisuje również nowe techniki diagnostyczne np.: oznaczanie przeciwciał przeciwko kompleksowi połączonej transglutaminazy tkankowej z cząsteczką gliadyny (98-100% czułości i 93-96% swoistości) oraz oznaczanie obecności limfocytów T immunokompetentnych w stosunku do kompleksów HLA DQ2- α -gliadyna. Na uwagę zasługują badania nad limfocytami T

pobieranymi z krwi obwodowej pacjentów z potwierdzoną obecnością antygenu zgodności tkankowej HLA DQ2, ponieważ wykazano, że krótkotrwałe stosowanie diety zawierającej gluten prowadzi do stymulacji limfocytów T wrażliwych na gliadynę w krwi obwodowej, dlatego badanie może być przydatne w przyszłości w celu potwierdzenia rozpoznania choroby trzewnej u pacjentów będących na diecie bezglutenowej, bez konieczności prowadzenia diety prowokacyjną przez dłuższy okres czasu, z drugiej strony badanie to może być przydatne w ocenie prawidłowego przestrzegania diety bezglutenowej.

Kończąc rozdział diagnostyka choroby trzewnej, autor opisuje postacie choroby trzewnej dodatkowo przedstawia w tabeli nr 4, postacie kliniczne zgodnie z ESPGHAN.

Kolejny rozdział to leczeni choroby trzewnej strony 37- 48; podstawowa metoda leczenia to dieta bezglutenowa, autor zwraca uwagę na dopuszczalne normy glutenu w produktach bez glutenowych na terenie Unii Europejskiej to 20mg w kilogramie produktu, zgodnie z aktualną wiedzą spożycie 10mg glutenu dziennie nie powinno powodować zaostrzenia choroby, aczkolwiek nawet śladowe ilości glutenu mogą prowadzić do przewlekłego stanu zapalnego w obrębie błony śluzowej jelit. Autor zwraca uwagę, na wpływ wieku chorego na stan wygojenia błony śluzowej jelit, wykazano że śladowe ilości glutenu wśród młodych pacjentów nie wpływa na prawidłową odbudowę kosmków i ustąpienia nacieku zapalnego, natomiast po 60 roku życia, zmiany histopatologiczne mogą nie ulegać pełnej remisji pomimo restrykcyjnego przestrzegania diety bezglutenowej. Lek. Marek Kowalski przedstawia również nowe strategie lecznicze: zastosowanie w procesie fermentacji mąki endopeptydaz naturalnie produkowanych przez szczepy bakteryjne i grzyby (*Flavobacterium meningosepticum*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*); doustna suplementacja endopeptydaz pozyskanych z *Aspergillus Niger* czy *Sphingomonas asputata*; modyfikacja odpowiedzi immunologicznej poprzez: szczepy probiotyczne zmniejszające proces zapalny (*Bifidobacterium spp.*), podawane podskórnie laryw (*Necator americanus*) czy badania nad szczepionkami. Inne proponowane innowacyjne metody leczenia to: inhibitory zonuliny (octan larazotydu – zakończone badania III fazy w 2021), inhibitory transglutaminazy tkankowej 2, syntetyczne białka mające powinowactwo do receptora HLA DQ2, próby leczenia przeciwciałami przeciwko TNFalfa- u pacjentów opornych na dietę. Podsumowanie wszystkich metod leczenia choroby trzewnej, autor przedstawił w rycinie 2 strona 48.

Kolejny rozdział to niedobór laktazy strona 49-53, lekarz Marek Kowalski omawia wtórne przyczyny niedoboru laktazy – wśród których jest choroba trzewna, wtórny niedobór laktazy może mieć również charakter przejściowy i jest wtórny do infekcji bakteryjnych i wirusowych przewodu pokarmowego, przewlekłego stosowania niesteroidowych leków przeciwzapalnych oraz antybiotykoterapii.

Diagnostyka niedoboru laktazy oparta jest na kosztownej analizie aktywności enzymatycznej w biopsatach jelita cienkiego, metoda znacznie tańsza to wodorowy test oddechowy.

W uzasadnieniu tematu pracy – strona 54 i 55, autor stawia tezę: Przy prawidłowej odbudowie kosmków jelitowych u pacjentów stosujących prawidłowo dietę bezglutenową nie powinno się stwierdzać wtórnego niedoboru laktazy. A wtórny niedobór laktazy może być obserwowany tylko u pacjentów popełniających błędy dietetyczne, jeżeli jest wykluczony pierwotny niedobór laktazy. Pierwotny niedobór laktazy można wykluczyć przez oznaczenie polimorfizm genu LCT, pozwala to ocenić również częstość współwystępowania choroby trzewnej i pierwotnego niedoboru laktazy. Dotychczas podobne analizy prowadzone były jedynie wśród dzieci ze świeżo rozpoznaną chorobą trzewną.

Wychodząc z tych założeń, lek. Marek Kowalski podjął się przeprowadzenia badań oceniających związek występowania wtórnego niedoboru laktazy, ocenianej wodorowym testem oddechowym z nieprawidłową kontrolą diety bezglutenowej.

Ta wstępna część pracy doktorskiej została bardzo szczegółowo opracowana w oparciu o liczne piśmiennictwo, Autor wykazał się bardzo dobrą znajomością podjętego tematu świadczy o tym sposób omówionej problematyki, podkreślający różnorodność objawów klinicznych oraz znaczenie prawidłowo przeprowadzonej diagnostyki choroby trzewnej. Ponad to, szczegółowo zostały omówienie nowe strategie leczenia choroby trzewnej.

W kolejnym rozdziale lek. Marek Kowalski przedstawił cel pracy:

Cele pracy szczegółowe: 1/.Weryfikacja rozpoznania choroby trzewnej uwzględniająca najnowsze wytyczne rozpoznania choroby trzewnej, w tym kryterium genetyczne. 2/. Ocena częstości występowania chorób współistniejących z chorobą trzewną. 3/. Ocena częstości dokonywania odstępstw świadomych i nieświadomych od stosowanej diety bezglutenowej u pacjentów z chorobą trzewną. 4/. Ocena częstości występowania objawów typowych i atypowych. 5/. Ocena częstości występowania określonych wariantów genetycznych HLA DQ2/DQ8 u pacjentów z potwierdzoną chorobą trzewną. 6/. Ocena częstości występowania niedoboru laktazy i stopnia jego zaawansowania wśród pacjentów z chorobą trzewną. 7/. Poszukiwanie zbieżności występowania niedoboru laktazy, popełniania błędów dietetycznych i podwyższonych stężeń przeciwciał przeciwko transglutaminazie tkankowej II.

W rozdziale Materiał i Metody (strony 57-62) lek. Marek Kowalski przedstawił szczegółowo charakterystykę badanej grupy oraz metodykę badań. Badana grupach to 57 chorych, którą poddano szczegółowej analizie, dotyczącej weryfikacji rozpoznania choroby trzewnej w przeszłości . W grupie

badanej wykonano analizę genetyczną antygenów zgodności tkankowej HLA DQ2.2, DQ 2.5 oraz DQ8 wraz z oceną alleli kodujących podjednostki α i β antygenów, zgodnie z obowiązującymi wytycznymi ESPHEGAN z 2020 r. Celem oceny stosowania rygorystycznej diety bezglutenowej i wyodrębnienia pacjentów popełniających błędy dietetyczne oznaczono w surowicy stężenia przeciwciał przeciwko transglutaminazie tkankowej II w klasie IgA oraz przeciwciał przeciwko deamidowanym peptydom gliadyny w klasie IgG metodą ELISA. Grupa kontrolna to 31 zdrowych ochotników. Ocenę ewentualnego niedoboru laktazy oceniano wodorowym testem oddechowym. Celem wykluczenia pierwotnego niedoboru laktazy, w grupie badanej z dodatnim wodorowym testem oddechowym, wykonano badanie genetyczne polimorfizmu w genie LCT. Przeprowadzono również badanie ankietowe dotyczące objawów klinicznych, chorób współistniejących, nawyków żywieniowych, aktywność fizycznej. Dodatkowo w grupie chorych przeprowadzono ankietę dotyczącą czas stosowania diety bezglutenowej, jej przestrzegania i częstość występowania świadomych błędów dietetycznych.

Kolejny rozdział zawiera wyniki badań (str 64-73), które lek. Marek Kowalski przedstawił w postaci opisowej oraz w 1 tabeli nr 5 i na 9 rycinach nr 3-11. Na szczególną uwagę zasługuje rycina 11, która przedstawia częstość występowania wariantów genów LCT, u osób ze stwierdzonym niedoborem laktazy za pomocą wodorowego testu oddechowego. Materiał graficzny rycin jest bardzo starannie wykonany i ilustruje uzyskane wyniki badań.

W dyskusji (strona 74-91) lek. Marek Kowalski omówił wyniki własnych badań i porównał je z wynikami innych autorów zajmujących się tą tematyką. W tej części pracy Doktorant, wykazuje bardzo dobrą znajomość tematu. Należy podkreślić, że zarówno w bardzo obszernym dobrze opracowanym wstępie, przemyślanej wnikliwie metodyce badania, ale także w dyskusji, lek. Marek Kowalski wykazuje się swobodną umiejętnością posługiwania się danymi z piśmiennictwa.

Lek. Marek Kowalski kończy pracę 7 krótkimi, zwięzłymi wnioskami (strona 92), które znajdują pełne potwierdzenie w przeprowadzonych badaniach i zawierają odpowiedź na założony cel pracy. Wsunięte wnioski to: 1/ Wśród pacjentów z chorobą trzewną rozpoznaną przed rokiem 2010 wskazana jest weryfikacja wcześniej postawionego rozpoznania na podstawie kryteriów ESPGHAN z roku 2020, z uwzględnieniem kryterium genetycznego. 2/ prawie jednej trzeciej chorych na chorobę trzewną występują inne choroby przewlekłe, zwłaszcza choroby autoimmunologiczne, jak cukrzyca t.1, choroby zapalne tarczycy oraz skóry. 3/ Ponad połowa chorych na chorobę trzewną nieświadomie lub świadomie popełnia błędy dietetyczne, co wskazuje na pilną potrzebę zwiększenia ich edukacji w zakresie diety. 4/ Niezależnie od przestrzegania diety bezglutenowej wśród pacjentów z celiakią obserwowano zarówno typowe, jak i nietypowe objawy choroby. 5/ Wśród pacjentów z chorobą

trzewną niedobór laktazy potwierdzono u większości badanych, z tego tylko u 55% stwierdzono pierwotny niedobór laktazy. 6/ W badanej grupie wykazano związek pomiędzy znacznym niedoborem enzymu laktazy a popełnianiem świadomych bądź nieświadomych błędów dietetycznych. 7/ Pacjenci z rozpoznaną przed laty celiakią, którzy nie spełniają kryterium genetycznego rozpoznania, częściej niż grupa kontrolna mają pierwotny niedobór laktazy.

Piśmiennictwo (str. 94-113) zawiera 442 pozycji literaturowych. Piśmiennictwo jest bardzo starannie opracowane, cytowane jest w pracy doktorskiej według kolejności omawianego problemu.

Oceniana praca doktorska lek. med. Marka Kowalskiego jest oryginalną pracą badawczą. Dotyczy ważnego zagadnienia klinicznego, jakim jest choroba trzewna. Choroba o złożonej etiologii, różnorodności objawów klinicznych, budząca nadal problemy diagnostycznych i terapeutycznych. Po raz pierwszy opisana została poprzez Wilhelma-Karela Dickego w 1950 roku, od tego okresu jest nadal tematem wielu badań naukowych, z uwagi na wszelaką różnorodności. Mając na uwadze zmieniające się w czasie wytyczne diagnostyczne, autor poddał analizie weryfikującej grupę chorych z rozpoznaniem choroby trzewnej w latach 1980 – 2010, po zastosowaniu wytycznych z 2020 z uwzględnieniem kryterium genetycznego, u 19 chorych z 57 z rozpoznaną wcześniej chorobą trzewną – podważono pierwotne rozpoznanie.

Doktorant, poddał analizie również występowania objawów klinicznych w badanej grupie chorych w zależności od popełniania świadomych lub nieświadomych błędów dietetycznych oraz ocenił czystość występowania schorzeń współistniejących, ze szczególnym uwzględnieniem niedoboru laktazy. Lek. med. Marek Kowalski, u większości chorych stwierdził niedobór laktazy, z tego aż 55% mało pierwotny niedobór laktazy ocenianej testem genetycznym (ocena wariantów genów LCT). Na uwagę zasługuje ostatni wniosek pracy stwierdzający że, pacjenci z rozpoznaną przed laty chorobą trzewną, którzy nie spełniają kryterium genetycznego rozpoznania, częściej niż grupie kontrolnej mają pierwotny niedobór laktazy.

Należy zwrócić uwagę, że w dostępnej literaturze podobna analiza był tylko przeprowadzona na grupie chorych pediatrycznych, bez uwzględnienia możliwości występowania pierwotnego niedoboru laktazy.

Doktorant jasno przedstawiła cel swoich badań, który w pełni zrealizował.

W tej bardzo dobrze zaplanowanej i wykonanej pracy lek. Marek Kowalski, przedstawił bardzo dokładnie i wiarygodnie wyniki swoich badań, które jednoznacznie potwierdzają wysunięte przez niego wnioski. Uzyskane wyniki posiadają duże znaczenie nie tylko poznawcze, ale także praktyczne.

Praca napisana jest poprawnym językiem polskim, wyniki badań są udokumentowane i przedstawione w postaci dobrych technicznie tabel i rycin, dyskusja jest prawidłowo przeprowadzona, a wnioski trafne, co świadczy o dojrzałości doktoranta i umiejętności prowadzenia pracy naukowej.

Przed podsumowaniem oceny chciałabym podać kilka uwag:

- W rozdziale Piśmiennictwo jest 442 pozycje !! Jest to znaczący nadmiar piśmiennictwa – wymagający weryfikacji – Doktorant musi poprawić umiejętność korzystania z piśmiennictwa.
- Bark informacji o uzyskanej zgodzie Komisji Bioetycznej – zwykle powinna się znajdować w Materiał i metody.
- Doktorant używa starego nazewnictwa PBC- pierwotna marskość żółciowa wątroby (np. strona 11i 13) od 2015 obowiązuje pierwotne zapalenie dróg żółciowych.
- Dla określenia rysunek – lepsze jest określenie ryciny dla przedstawianych średnich.
- Umieszczony podpis ryciny 9 jest niepełny – brak oznaczenia dla grupy kontrolnej.
- Dyskusja strona 74- . u 10 (26,3%) pacjentów w grupie badanej ? (której 1 czy 2?), wykazano współistnienie innych...

Powyższe uwagi podałam z obowiązku recenzenta. Być może będą one pomocne Doktorantowi przy przygotowywaniu ewentualnych publikacji. Pragnę jednak podkreślić, że uwagi te w żadnym stopniu nie obniżają wartości ocenianej niezwykle interesującej i ważnej pracy badawczej, jaką podjął się przeprowadzić i przedstawić w formie pracy doktorskiej autor. Wartość tej pracy polega bowiem na starannym zaplanowaniu zagadnienia badawczego, poprawnym przygotowaniu grup chorych, sumiennym wykonaniu badań i starannym przeanalizowaniu wyników, przejrzystym ich przedstawieniu i wartościowym przedyskutowaniu z uwzględnieniem dostępnego piśmiennictwa.

W podsumowaniu uważam, że rozprawa doktorska lek. Marka Kowalskiego spełnia formalne wymagania określone w ustawie o stopniach naukowych i tytule naukowym, w związku z powyższym przedkładam Wysockiej Radzie Nauk Medycznych Uniwersytetu Medycznego w Łodzi wniosek o dopuszczenie lek. Marka Kowalskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Prof. dr hab. med. Danuta Owczarek

Prof. dr hab. med. Danuta Owczarek
specjalista chorób wewnętrznych
specjalista gastroenterologii
2366839

