

## Ocena

dysertacji lek med. Alicji Makruszewskiej -Kuczyńskiej

pt: „Badania nad znaczeniem diagnostyki morfologicznej szpiku

kostnego w rozpoznaniu choroby Gauchera”

na stopień doktora nauk medycznych Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu  
Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu.



UNIwersytet  
JAGIELLOŃSKI  
COLLEGIUM  
MEDICUM

Postęp w metodyce badań diagnostycznych i farmakologicznych daje możliwość nie tylko wczesnego rozpoznania ale również wdrożenia odpowiedniego leczenia w przypadku rzadkich chorób metabolicznych. Jedną z tzw. rzadkich lizosomalnych chorób spichrzeniowych jest choroba Gauchera (GD). Wrodzony blok metaboliczny który poprzez swój progresywny charakter wraz z upływem czasu wiedzie do coraz silniejszych dolegliwości i często nieodwracalnych zmian i powikłań u pacjenta. W przypadku choroby Gauchera znanych jest kilka modeli terapii jak ERT (enzymatyczna terapia zastępcza) SRT (terapia redukcji substratu), leczenie kombinowane bądź też badane obecnie terapie addytywne przy zastosowaniu chaperonów. Nie zależnie jednak od zastosowanego modelu leczenia istotnym jest czas włączenia leków, tak by nie dopuścić do nasilenia objawów lub do rozwoju nieodwracalnych powikłań takich jak np. destrukcja układu kostnego.

Dlatego też kluczowe jest szybkie i trafne zdiagnozowanie choroby rzadkiej, co niestety nadal stanowi problem kliniczny. Szacuje się że opóźnienie w postawieniu ostatecznego rozpoznania potrafi sięgać nawet 10 lat. Równocześnie ze względu na bardzo zróżnicowany obraz kliniczny, ocenia się że w przypadku choroby Gauchera 50-75% przypadków jest niezdiagnozowanych.

W trakcie rozwoju objawów i postępu choroby, pacjenci z GD manifestują różnego rodzaju zaburzenia w obrazie morfologii krwi, przy równoczesnym powiększeniu wymiarów wątroby i śledziony, przez co są kierowani do hematologa. U dużego odsetka chorych postępowanie diagnostyczne rozpoczyna się dopiero po wykonaniu biopsji aspiracyjnej szpiku (ASP) czy trepanobiopsji (TB) i stwierdzeniu tam komórek Gauchera. Biopsja szpiku na stałe weszła do etapów diagnostycznych GD. Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska jest próbą zmiany podejścia i interpretacji uzyskiwanych wyników badań. Oryginalnym zamysłem pracy jest ocena przydatności inwazyjnego badania diagnostycznego jak ASP i TB, oraz zwrócenie uwagi na pułapki interpretacyjne w diagnostyce morfologicznej szpiku, jakie mogą czekać na specjalistę opisującego wynik rozmazu.

Wydział Lekarski

Katedra i Klinika

Chorób Metabolicznych

PL 31-501 Kraków

ul. Kopernika 15

tel. +48 12 424 83 31

+48 12 424 83 01

+48 12 424 83 00

fax +48 12 421 97 86

metabol@cm-uj.krakow.pl

metabol.cm-uj.krakow.pl

Przedstawiona do oceny dysertacja składa się z następujących akapitów: streszczenia, wstępu, założeń i celu pracy, materiału i metodyki, oraz cyklu publikacji (sumaryczny IF 3,18):



UNIwersytet  
JAGIELLOŃSKI  
COLLEGIUM  
MEDICUM

Praca poglądowa:

Markuszevska-Kuczyńska A, Machaczka M. Zarys objawów klinicznych. Leczenia oraz trudności w rozpoznaniu choroby Gauchera. Acta Haematologica Pol 2015;46(2):149-157.

Prace oryginalne

Machaczka M, Markuszevska-Kuczyńska A, Regenthal S, Jurczyszyn A, Gałązka K, Wahlin BE, Klimkowska M. Clinical utility of different bone marrow examination methods in the diagnosis of adults with sporadic Gaucher disease type 1. Pol Arch Med Wewn. 2014;124(11):587-92.

Wydział Lekarski

Markuszevska-Kuczyńska A, Klimkowska M, Regenthal S, Bulanda A, Kämpe Björkvall C, Machaczka M. Atypical cytomorphology of Gaucher cells is frequently seen in bone marrow smears from untreated patients with Gaucher disease type 1. Folia Histochem Cytobiol. 2015;53(1):62-9.

Katedra i Klinika

Chorób Metabolicznych

Praca kazuistyczna

Markuszevska-Kuczyńska A, Kämpe Björkvall C, Lorenz F, Kleinotiene G, Klimkowska M, Machaczka M. Długotrwała pancytopenia po chemioterapii jako objaw demaskujący chorobę Gauchera u pacjentki z rakiem płuca. Acta Haematol Pol. 2014; 45(3):294-300.

Podsumowania i wniosków oraz złączników obejmujących oświadczenia współautorów prac, Opinii Komisji Bioetycznej oraz wykazu doniesień i prac Kandydatki.

**Wstęp** do cyklu publikacji stanowi systematyczny opis choroby Gauchera od zarysu historycznego, poprzez ogólny opis patomechanizmów choroby aż do przedstawiania objawów klinicznych, przy zaakcentowaniu głównie dolegliwości hematologicznych, co stanowi temat zainteresowania Kandydatki. Napisana w sposób przystępny charakterystyka kliniczna ułatwia zrozumienie problemów chorób rzadkich. Doktorantka w sposób szczegółowy wypunktowała główne objawy i różnice w trzech typach klinicznych choroby Gauchera. W sposób czytelny, może jednak w zbyt ogólny omówiła cechy badania histopatologicznego rozmazów szpiku, szczególnie że ten temat stanowi cel badań i główny temat jej pracy.

Równocześnie Kandydatka podkreśla niekorzystne efekty zdrowotne dla pacjentów powstające w wyniku przedłużającej się diagnostyki i wynikającego z opóźnienia rozpoczęcia terapii.

PL 31-501 Kraków

ul. Kopernika 15

tel. +48 12 424 83 31

+48 12 424 83 01

+48 12 424 83 00

fax +48 12 421 97 86

metabol@cm-uj.krakow.pl

metabol.cm-uj.krakow.pl



W opisie opcji terapeutycznych Doktorantka skupiła się głównie na uznanej i efektywnej terapii ERT, wspomina również o leczeniu metodą SRT. Pomięła natomiast inne obserwacje i badania jak addytywna terapia chaperonowa, czy trwające badania nad terapią genową (z wyjątkiem wspomnianego przez nią, allogenicznego przeszczepu szpiku). Jest to zaskakujące gdyż doniesienia w tej dziedzinie opublikowano już w 2013 roku.

W przytoczonej bibliografii samego wstępu zwraca uwagę stosunkowo małą ilość nowych pozycji literaturowych. Spośród cytowanych artykułów głównie użyto informacji ogłoszonych w latach 2004-2013r. Z 37 prac zaledwie 6 jest opublikowanych po 2014 roku, w tym najnowsza praca to 1 publikacja z 2017 roku.

**Cele pracy.** Wstęp oparty na pracy pogładowej, wiedzie do sformułowania celów pracy przedstawionych jasno i zawierających skrót zadań badawczych podjętej pracy. Bardzo praktyczne i odważne założenia pracy, mają odpowiedzieć na postawione pytania:

- przydatności jednego z głównie wymienianych inwazyjnych badań diagnostycznych jakim jest ocena cytologiczna biopsji aspiracyjnej szpiku (ASP) czy trepanobiopsji (TB) w diagnostyce lizosomalnej choroby spichrzeniowej jaką jest GD.
- oceny polimorfizmu komórek Gauchera oraz odsetkowego występowania komórek Gauchera w preparatach cytomorfologicznych szpiku kostnego
- czy przedłużająca się pancytopenia w trakcie leczenia przeciwnowotworowego może nasuwać podejrzenia GD.

**Metody** przedstawione są w sposób szczegółowy, co świadczy o praktycznej znajomości używanego warsztatu doświadczalnego i umiejętności współpracy między ośrodkami.

Materiał biopsyjny, będący późniejszym tematem dwóch prac oryginalnych został pobrany od 6 pacjentów, pochodzenie nie-żydowskiego, u których w trakcie procesu diagnostycznego choroby Gauchera typu 1, wykonano ASP czy TB. Pacjenci scharakteryzowani klinicznie jak i biochemicznie, pozostawali pod opieką Szpitala Uniwersyteckiego Karolinska w Sztokholmie i stanowili 17% populacji chorych z GD1 w Szwecji. Ostatnia publikacja wchodząca w cykl prac, będąca pracą kazuistyczną, dotyczyła pojedynczego przypadku chorej z rakiem płuc u której stwierdzono współwystępowanie choroby nowotworowej oraz wrodzonego schorzenia metabolicznego, GD1. Wykonanie ASP oraz TB odbyło się wg standardowej procedury, materiał cytologiczny, po rutynowym wybarwieniu był oceniany przez doświadczonych hemopatologów.

U wszystkich pacjentów wykonywano badania aktywności enzymatycznej w krwi obwodowej (beta-glukocerebrozydazy i chitotriozydazy) oraz metodą biologii molekularnej (badania genetyczne - bezpośredniego sekwencjonowania), ostatecznie potwierdzające rozpoznanie GD oraz jej typu. Interesującym a zrazem niepokojącym jest fakt, że aż 50% osób w badanej grupie zostało poddanych procedurze splenektomii. Zabiegowi, który nie jest rekomendowany u pacjentów z lizosomalną chorobą spichrzeniową.



UNIwersytet  
JAGIELLOŃSKI  
COLLEGIUM  
MEDICUM

Wydział Lekarski

Katedra i Klinika

Chorób Metabolicznych

PL 31-501 Kraków

ul. Kopernika 15

tel. +48 12 424 83 31

+48 12 424 83 01

+48 12 424 83 00

fax +48 12 421 97 86

metabol@cm-uj.krakow.p

metabol.cm-uj.krakow.pl



Równocześnie zwraca uwagę staranność przeprowadzenia obliczeń statystycznych, gdzie sama autorka zaznaczyła że tak mała liczebność analizowanej grupy na istotny wpływ na same analizy statystyczne, interpretację wyników i wymagała zastosowania odpowiednich testów statystycznych.

**Wyniki i Dyskusja.** Omawiane wyniki zostały opublikowane jako dwie prace oryginalne (*Pol Arch Med. Wew 2014; Folia Histochem Cytobiol 2015*) oraz jako praca kazuistyczna (*Acta Haematol Pol 2015*).

Kandydatka w sposób systematyczny i dojrzały, krytycznie przedstawia opracowanie wyników badań.

W pracach oryginalnych uwagę poświęcono zagadnieniu użyteczności klinicznej badań ASP i TB szpiku w rozpoznaniu choroby Gauchera typu 1. W opracowaniu materiału pobranego w biopsji aspiracyjnej szpiku wykazano że na dużą liczbę, bo aż 1000 analizowanych komórek odsetkowa zawartość komórek Gauchera wynosiła zaledwie 0,4%. Nieco lepiej wyglądała sytuacja w przypadku trepanobiopsji gdzie odsetek ten wynosił 28%. W pracy tej co prawda wykazano wyraźną przewagę trepanobiopsji vs biopsja aspiracyjna w wykrywaniu komórek Gauchera, jednak autorzy opracowania wyraźnie zaznaczyli że obydwie techniki nie powinny być rekomendowanymi metodami diagnostycznymi dla GD. Niski odsetek komórek Gauchera w ASP i TBC, zwiększa ryzyko ich przeoczenia i wydania wyniku fałszywie ujemnego co istotnie opóźni postawienie ostatecznej diagnozy.

Autorka wykazała kolejną trudność diagnostyczną w badaniach cytologicznych chorych z GD. Zwróciła uwagę na bardzo dużą różnorodność form komórek Gauchera. Podczas analiz wykazano aż siedem różnych morfologicznie form tych komórek, gdzie różnorodność dotyczyła zarówno wielkości, kształtu samych komórek, charakteru ich cytoplazmy oraz lokalizacji czy ilości jąder komórkowych. Wykazano że atypowe formy do typowych morfologicznie komórek Gauchera w materiale od pacjentów z typem 1 choroby Gauchera, występują w proporcji aż 29%. Typowe morfologicznie komórki Gauchera, z centralnie położonym jądrem, występowały u 83% z badanej grupy chorych. Z atypowych form natomiast najczęstsze były formy syncytio-podobne (12%) czy formy ze sfagocytowanymi elementami morfologicznymi jak eryocyty (6%) czy płytki krwi (2,5%). Istnieją co prawda wcześniejsze doniesienia o atypowych formach morfologicznych komórek Gauchera, jednakże przedstawiona praca po raz pierwszy w sposób tak systematyczny i dokładny dokonuje analizy cytologicznej i ilościowej tych komórek. Publikacja ta jest nie tylko dobrym podsumowaniem trudności diagnostycznych i interpretacyjnych obrazu szpiku w chorobie Gauchera, ale wykazuje jakich zmian może się spodziewać hematopatolog, na co winien zwrócić uwagę by uniknąć wydania fałszywie-ujemnego wyniku w kierunku GD.

Praca kazuistyczna opisuje przypadek 48 letniej chorej leczonej z powodu raka drobnokomórkowego płuc, z utrzymującą się małopłytkowością i agranulocytozą, które uniemożliwiły pełnodawkowe leczenie chorej. Opis przypadku akcentuje kilka istotnych aspektów klinicznych. Jednym z nich jest



UNIWERSYTET  
JAGIELLOŃSKI  
COLLEGIUM  
MEDICUM

Wydział Lekarski

Katedra i Klinika

Chorób Metabolicznych

PL 31-501 Kraków

ul. Kopernika 15

tel. +48 12 424 83 31

+48 12 424 83 01

+48 12 424 83 00

fax +48 12 421 97 86

metabol@cm-uj.krakow.pl

metabol.cm-uj.krakow.pl



wielobrazowość choroby Gauchera typu 1, co przyczynia się do istotnego opóźnienia postawienia ostatecznego rozpoznania. Z drugiej strony Autorka porusza problem współwystępowania chorób nowotworowych z GD. Należy przecież pamiętać że to schorzenie metaboliczne istotnie zwiększa ryzyko chorób nowotworowych, nie tylko hematologicznych, u tych pacjentów. Kolejnym ważnym wątkiem jest podkreślenie konieczności stosowania wysokodawkowej (nawet 60j/kg mc) enzymatycznej terapii zastępczej u chorych z chorobą Gauchera z różnymi powikłaniami w tym onkologicznymi lub zaburzeniami hematologicznymi (nacieczenie szpiku). Nie jest to co prawda praca oryginalna, jednakże wnosi ciekawe i praktyczne obserwacje i sugestie które mogą być wykorzystane w praktyce klinicznej opieki nad chorymi z chorobą Gauchera typu 1.



UNIWERSYTET  
JAGIELLOŃSKI  
COLLEGIUM  
MEDICUM

**Podsumowanie i wnioski** - stanowią nieco zbyt krótkie podsumowanie wyników badań i dyskusji.

Przy czytaniu powyższej dysertacji, nasunęły się recenzentowi nieliczne uwagi i komentarze.

- Oczywiście słabym punktem pracy jest mała ilość pacjentów, która istotnie mogła zawążyć na sile testów statystycznych. Z jednej strony oczywiście trzeba wziąć pod uwagę że badania dotyczą choroby rzadkiej, a przedstawiona grupa chorych stanowi 17% szwedzkiej populacji pacjentów ze zdiagnozowaną GD. Bardzo rozsądnym posunięciem było wybranie do analiz chorych z jednym typem GD, aby uniknąć kolejnych istotnych elementów zaburzających analizy. Ważnym jest również że badani chorzy, byli to tzw. „pacjenci naiwni”, nie byli jeszcze poddani ERT. Leczenie to bowiem zmienia obraz morfologii szpiku. Równocześnie w charakterystyce grupy zwraca uwagę mała jednorodność grupy badanej duża rozpiętość wieku badanych (przedział wiekowy między 21 do 84 lat). Poza jedną osobą pozostali pacjenci byli wieku powyżej 50 lat; co potwierdza znamienne opóźnienie w diagnostyce i rozpoznaniu GD. U części badanych chorych dodatkowo usunięto śledzionę- kolejny czynnik zakłócający analizy, jednak zmienna ta podzieliła grupę na 2 równe podgrupy umożliwiając dalsze analizy.

- Przy tak starannie i ciekawie opracowanych wynikach rozczarowuje podrozdział „Podsumowanie i Wnioski”, szczególnie że brak jest podrozdziału „Dyskusja”. Prace wchodzące w skład pracy doktorskiej opublikowane zostały w 2014 i 2015 roku, od tego czasu pojawiły się nowe obserwacje i doniesienia dotyczące chociażby leczenia i diagnostyki choroby Gauchera, w omawianej rozprawie zaś zdecydowanie brak uaktualnienia danych literaturowych.

- Przez samą doktorantkę został poruszony bardzo ciekawy i istotny z klinicznego punktu widzenia wątek efektywności ERT/SRT w prewencji transformacji nowotworowej u pacjentów z chorobą Gauchera. Niestety wątek ten nie został opatrzony żadnym dodatkowym komentarzem ze strony kandydatki, chociażby co do potencjalnych, teoretycznych mechanizmów powyższego działania.

Wydział Lekarski

Katedra i Klinika

Chorób Metabolicznych

PL 31-501 Kraków

ul. Kopernika 15

tel. +48 12 424 83 31

+48 12 424 83 01

+48 12 424 83 00

fax +48 12 421 97 86

metabol@cm-uj.krakow.pl

metabol.cm-uj.krakow.pl



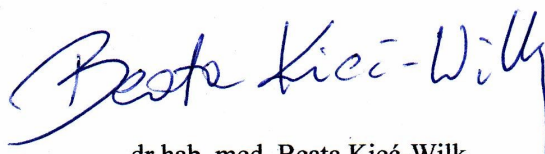
- Zwraca uwagę brak jasno wypunktowanych wniosków wynikających ze wszystkich przedstawionych prac oraz zebrania ich w jedną spójną całość. Biorąc pod uwagę różnorodność poruszonych tematów; usystematyzowanie informacji ułatwiłoby ich czytanie.

- W rozdziale „podsumowanie i wnioski” zwracają uwagę niedociągnięcia edytorskie tekstu, które nie występują w pozostałych częściach rozprawy.

Powyższe uwagi poczynione pod wpływem sumiennego opracowania opisu badań i wyników, stanowią refleksje recenzenta po przeczytaniu omawianej rozprawy doktorskiej. Rozprawa świadczy o nowoczesnym i sumiennym podejściu Doktorantki, nie tylko do warsztatu badań naukowych ale również do zagadnień praktyki lekarskiej.

Rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2013 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. Nr 65, poz. 595, z późn.zm.). Na tej podstawie zwracam się do Wysokiej Rady Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu, o nadanie biegu dalszym etapom przewodowi doktorskiego lek med. Alicji Markuszewskiej-Kuczyńskiej.

Kraków 15 maja 2018



dr hab. med. Beata Kieć-Wilk

dr hab. med. Beata Kieć-Wilk  
specjalista chorób wewnętrznych  
- diabetologii, endokrynologii  
3562699



UNIWERSYTET  
JAGIELLOŃSKI  
COLLEGIUM  
MEDICUM

Wydział Lekarski

Katedra i Klinika

Chorób Metabolicznych

PL 31-501 Kraków

ul. Kopernika 15

tel. +48 12 424 83 31

+48 12 424 83 01

+48 12 424 83 00

fax +48 12 421 97 86

metabol@cm-uj.krakow.pl

metabol.cm-uj.krakow.pl