

Recenzja rozprawy doktorskiej lekarz Moniki Seifert  
pt. „**Ocena roli szlaku RANKL/RANK/OPG u dzieci z somatotropinową  
niedoczynnością przysadki zakwalifikowanych do terapii rekombinowanym hormonem  
wzrostu**”

Substytucyjne leczenie hormonem wzrostu dzieci z somatotropinową niedoczynnością przysadki ma na celu przede wszystkim poprawę wysokości ciała poprzez wzrost kości na długość. Wieloletnie obserwacje kliniczne i liczne doniesienia naukowe wskazują na to, że hormon wzrostu (GH) jako jeden z niezwykle ważnych hormonów anabolicznych u człowieka oprócz działania metabolicznego w zakresie gospodarki białkowej, węglowodanowej i tłuszczowej przyspiesza przebudowę kości, zwiększa mineralną masę kostną, wywiera korzystny wpływ na tworzenie szczytowej masy kostnej, zabezpieczając przed konsekwencjami osteopenii i osteoporozy. Wiadomo też, że w warunkach fizjologicznych GH zwiększa obrót kostny, z przewagą kościotworzenia nad procesami resorpcji kostnej, poprawia gęstość mineralną kości i zawartość minerałów w kościach. Poprzez receptory zlokalizowane w osteoblastach stymuluje ich aktywność i proliferację, ale też zwiększa liczbę i różnicowanie osteoklastów. Pośrednie działanie na kości hormon wzrostu wywiera za pośrednictwem insulinopodobnego czynnika wzrostu typu I (IGF-1).

Kość należy do jednego z najbardziej aktywnych metabolicznie organów człowieka, w którym przez całe życie zachodzą intensywne procesy modelowania struktury tkankowej. Przebudowa kości (*remodelling*) trwa nieprzerwanie, zaś w okresie wzrastania aż do osiągnięcia pełnej dojrzałości zachodzą dodatkowo procesy budowania kości (*modelling*).

Przemiany zachodzące w kościach można śledzić oznaczając znane już od dawna parametry obrotu kostnego, tzw. markery kościotworzenia (wysoko swoiste, jak: frakcja kostna fosfatazy alkalicznej, osteokalcyna lub mniej swoiste C-końcowe i N-końcowe propeptydy prokolagenu typu I) oraz markery kościoresorpcji oznaczane we krwi (telopeptyd karboksyterminalny kolagenu typu I- ICTP lub w moczu (wysoko swoisty N-końcowy telopeptyd łańcucha- $\alpha$  kolagenu typu I- Ntx, czy C-końcowy usieciowany telopeptyd łańcucha- $\alpha$ - Ctx).

U dzieci i młodzieży w okresie wzrostu kości na długość obserwuje się wielokrotnie wyższe aniżeli u dorosłych stężenia markerów obrotu kostnego we krwi i w moczu, które dodatnio korelują z szybkością wzrastania. To stanowi pośredni dowód na bardziej intensywne procesy przebudowy i modelowania kości u dzieci niż u dorosłych.

Z kolei obserwacje prowadzone u osób z niedoborem hormonu wzrostu, zarówno u dzieci, jak i u dorosłych wskazują na niższe niż u zdrowych stężenia markerów obrotu kostnego, które istotnie wzrastają w trakcie terapii rekombinowanym hormonem wzrostu. Badania te dotyczyły dotychczas głównie wymienionych wcześniej markerów kościotworzenia, jak osteokalcyna, ALP, hydroxyprolina, C-końcowy propeptyd prokolagenu typu I.

Poznanie nowego szlaku RANKL/RANK/OPG (RANKL/RANK/osteoprotegeryna) odgrywającego niezwykle istotną rolę w procesach remodellingu kości przyczyniło się do lepszego zrozumienia mechanizmów molekularnych i biochemicznych zachodzących w komórkach macierzy kostnej: osteoblastach, osteocytach i osteoklastach. Osteoblasty, wywodzące się z mezenchymalnych komórek macierzystych zrębu syntetyzują nie tylko składniki istoty międzykomórkowej kości- osteoidu: kolagen typu I i proteoglikany, białka regulujące mineralizację osteoidu- osteonektynę i osteokalcynę, kolagenazę i prostaglandyny, ale także białko- osteoprotegerynę (OPG). Osteoprotegeryna łącząc się z błonową lub rozpuszczalną formą glikoproteiny RANKL (*receptor activator nuclear factor κ ligand*) uniemożliwia jej kontakt receptorem RANK na powierzchni linii rozwojowej osteoklastów. OPG wpływa na stabilizację mineralną osteoidu, uczestnicząc w modelowaniu kości. Na powierzchni błony komórkowej i jąder oprócz RANKL osteoblasty mają receptory dla szerokiego spektrum steroidów, hormonów peptydowych, czynników wzrostowych i cytokin: m.in. witaminy D, estradiolu, testosteronu, PTH, insuliny, IGF-1 i innych. Dzięki tej ogromnej zdolności receptorowej do odbioru parakrynych i systemowych sygnałów biologicznych oraz możliwościom wydzielniczym właśnie osteoblasty zawdzięczają swoją zasadniczą rolę w przebudowie kości, w kościotworzeniu i sterowaniu resorpcją poprzez wpływ na dojrzewanie i aktywność osteoklastów. Osteoklasty, wywodzące się z makrofagów szpiku kostnego wykazują na swojej powierzchni receptor- glikoproteinę RANK, która może łączyć się z ligandem RANKL na powierzchni osteoblastów i za pomocą czynnika transkrypcyjnego c-Fos promować dojrzewanie i aktywność osteoklastów. Osteoklasty w przeciwieństwie do osteoblastów nie posiadają receptorów dla witaminy D i PTH, nie produkują też kolagenazy degradującej kolagen kości. Produkują ją osteoblasty w odpowiedzi na zakwaszenie kości przeznaczonej do resorpcji, niejako „na zamówienie”

osteoklastów. Jest to interesujące zjawisko udziału osteoblastów w procesie resorpcji kości po połączeniu się RANK osteoklastu z RANKL osteoblastu. W tym układzie osteoprotegeryna jest fizjologicznym receptorowym neutralizatorem RANKL.

Badania dotyczące szlaku RANKL/RANK/OPG prowadzone u chorych z zaburzeniami wydzielania hormonu wzrostu są jak do tej pory pojedyncze. Badanie Lanzi i wsp. dotyczyło oceny stężenia OPG w surowicy krwi u chorych dorosłych z niedoborem hormonu wzrostu. Inne badanie, autorstwa Flint i wsp. wykonane u 54 dzieci z somatotropinową niedoczynnością przysadki nie wykazało różnic w stężeniach OPG i RANKL we krwi w grupie badanych w porównaniu do dzieci zdrowych. Inne badanie także nie potwierdziło różnic w stężeniach osteoprotegeryny we krwi pomiędzy grupą chorych z niedoborem hormonu wzrostu, nadmiarem hormonu wzrostu spowodowanym akromegalią a osobami zdrowymi z prawidłowym stężeniem GH. W dostępnym piśmiennictwie nie ma dotychczas prac na temat oceny szlaku RANKL/RANK/OPG u dzieci z somatotropinową niedoczynnością przysadki w trakcie leczenia ich hormonem wzrostu.

Dlatego z uznaniem należy przyjąć wybór tematu rozprawy doktorskiej, w której lekarz Monika Seifert podjęła próbę oceny roli szlaku RANKL/RANK/OPG u dzieci z somatotropinową niedoczynnością przysadki zakwalifikowanych do terapii rekombinowanym hormonem wzrostu. Temat jest niezwykle interesujący z powodu jego oryginalności i nowatorstwa.

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa, licząca 121 stron maszynopisu, składa się z rozdziałów typowych dla tego rodzaju prac.

We wstępie, na początku doktorantka zwraca uwagę na problem niedoboru wzrostu który dotyka ok. 3 % populacji dzieci i wskazuje, że jedną z przyczyn niskorosłości jest somatotropinowa niedoczynność przysadki.

W poszczególnych podrozdziałach opisuje strukturę tkanki kostnej i zagadnienia dotyczące kości jako organu aktywnego metabolicznie, w którym zachodzą procesy przebudowy, omawia szlak RANKL/RANK/OPG i osteokalcynę. Następne podrozdziały wstępu zawierają informacje na temat wzrostu i rozwoju człowieka, wybranych endokrynologicznych czynników wzrostowych (w tym hormonu wzrostu, IGF-1 i jego białek wiążących, hormonów tarczycy, witaminy D3). Na stronach 23-24 podaje definicję i informacje na temat somatotropinowej niedoczynności przysadki (SNP). Dalej na stronach 24-27 opisuje i podaje przyczyny niedoboru wzrostu u dzieci. Następne strony (28-30) zawierają znowu informacje dotyczące SNP- tym razem na temat diagnostyki i terapii tego schorzenia. Według mnie wstęp mógłby być ułożony w sposób bardziej usystematyzowany-

tj. lepiej byłoby gdyby zawierał najpierw wszystkie informacje, które doktorantka chciała zawrzeć na temat przyczyn niskorosłości, częstości występowania itd., a następnie w jednym podrozdziale wszystko to, o czym napisała na temat somatotropinowej niedoczynności przysadki. Ułatwiłoby to znacznie lekturę pracy i nie wprowadzałoby niepotrzebnego „chaosu”.

Następnym rozdziałem dysertacji jest „Cel pracy”. Według mnie- jako recenzenta w pracy brakuje opisu założeń projektu badawczego, co ułatwiłoby zrozumienie celu pracy. Doktorantka dopiero w rozdziale „Dyskusja” (str. 80) pisze, że cyt. „W literaturze brak jest doniesień na temat roli szlaku RANKL/RANK/OPG u dzieci z SNP podczas terapii rhGH. Prezentowane badania są pierwszymi, w których oceniano wpływ leczenia hormonem wzrostu na szlaki metaboliczne kości”. Taka adnotacja powinna się znaleźć w założeniach pracy. W pierwszej części swojej recenzji przedstawiłam dane z aktualnego piśmiennictwa, które powinna była zawrzeć doktorantka we wstępie i założeniach pracy.

W rozdziale „Cel pracy” doktorantka pisze, że celem pracy jest ocena szlaku: receptor aktywujący jądrowy czynnik NF-kB (RANK) / ligand receptora aktywującego jądrowy czynnik NF-kB (RANKL) / osteoprotegeryna (OPG) w metabolizmie układu kostnego u dzieci z SNP leczonych preparatem rhGH oraz jego wpływ na tempo wzrastania w pierwszym roku terapii. Cel pracy jest zasadny, zrozumiały i dobrze sformułowany.

Doktorantka wyznaczyła sobie następujące szczegółowe cele pracy. Jest to ocena:

1. wpływu terapii rhGH na szlak RANKL/RANK/OPG we krwi obwodowej u dzieci z SNP przed leczeniem oraz w pierwszym roku terapii.
2. efektu leczenia rhGH, w oparciu o zmianę tempa wzrastania w momencie rozpoczęcia oraz w pierwszym roku terapii i jego korelacji ze szlakiem RANKL/RANK/OPG, 25(OH)D<sub>3</sub>, 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> oraz z osteokalcyną i IL-6.
3. wpływu terapii rhGH na stężenia 25(OH) D<sub>3</sub> oraz 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> i osteokalcyny, IL-6 we krwi obwodowej u dzieci z SNP przed leczeniem oraz w pierwszym roku terapii.
4. wpływu terapii rhGH na gospodarkę wapniowo-fosforanową przed oraz w trakcie terapii.

Chciałam zwrócić uwagę, że w tych wymienionych wyżej szczegółowych celach pracy znalazły się niefortunne określenia „wpływ terapii rhGH ...przed leczeniem”- bo wiadomo, że nie da się oceniać wpływu terapii przed wprowadzeniem leczenia, ale dopiero w trakcie leczenia.

W rozdziale „Materiał i metody” doktorantka zawarła szczegółową charakterystykę grupy badanej (70 dzieci) zakwalifikowanych do badań, leczonych preparatem hormonu wzrostu

w latach 2013-2016, pozostających pod opieką Kliniki Endokrynologii i Diabetologii Wieku Rozwojowego we Wrocławiu oraz grupy kontrolnej (22 dzieci) bez zaburzeń wzrastania, gospodarki wapniowo-fosforanowej i innych chorób mogących mieć wpływ na proces wzrastania. Podała dane dotyczące pomiarów antropometrycznych wszystkich badanych dzieci. Wskaźniki antropometryczne w czasie kolejnych wizyt dzieci leczonych GH przedstawiła graficznie w tabeli 5.1. Dokładnie opisała metodykę badań poszczególnych badanych parametrów, tj. RANKL, RANK, osteoprotegeryny, osteokalcyny, IL-6, 25(OH) witaminy D3, 1,25(OH)<sub>2</sub> witaminy D3.

Doktorantka zastosowała prawidłowo dobrane metody statystyczne.

Wyniki badań doktorantka przedstawiła obszernie w tekście oraz zawarła w 19 tabelach i na 40 wykresach. Wykazała, że u dzieci z SNP zakwalifikowanych do terapii preparatem rhGH stężenia RANKL, RANK i OPG różniły się od stężeń u dzieci zdrowych. I tak, średnie stężenie RANKL u dzieci z SNP w 6 miesiącu terapii było istotnie statystycznie niższe w porównaniu z jego stężeniem u dzieci z grupy kontrolnej, natomiast przed włączeniem terapii rhGH i po 12 miesiącach leczenia stężenie RANKL było nieznacznie niższe niż u dzieci w grupie kontrolnej. Średnie stężenie RANK u dzieci z SNP przed rozpoczęciem leczenia było istotnie statystycznie wyższe od stężenia RANK u dzieci zdrowych. Wraz z trwaniem terapii rhGH obserwowano stopniowy spadek stężenia RANK, po 12 miesiącach leczenia stężenia RANK były porównywalne w obu grupach, natomiast średnie stężenie OPG u dzieci z SNP było istotnie statystycznie wyższe w porównaniu z dziećmi zdrowymi, zarówno przed rozpoczęciem terapii rhGH, jak i w 6 czy 12 miesiącu leczenia. Ponadto wykazała, że stężenia osteokalcyny u dzieci z SNP przed leczeniem i w grupie kontrolnej były porównywalne, natomiast w 6 i 12 miesiącu terapii stężenie OC było istotnie statystycznie wyższe u dzieci z SNP. W 6 i 12 miesiącu terapii rhGH odnotowała pozytywną korelację stężenia pomiędzy stężeniem RANKL we krwi a tempem wzrastania.

W dyskusji, która zawiera tylko 12 stron maszynopisu, w tym 6 podrozdziałów doktorantka konfrontuje uzyskane wyniki z wynikami innych autorów. Omawia poszczególne wyniki własnych badań, odnosząc się do dotychczasowych danych literaturowych.

Następnie doktorantka przedstawia ponownie wyniki swoich badań w rozdziale „Podsumowanie”. W mojej opinii ten rozdział powinien znaleźć się bezpośrednio po prezentacji wyników, a nie po ich omówieniu.

W rozprawie doktorantka zamieściła 191 pozycji piśmiennictwa, w tym polskiego i anglojęzycznego. Piśmiennictwo jest prawidłowo dobrane i aktualne.

W oparciu o uzyskane wyniki doktorantka sformułowała następujące wnioski:

1. Stężenia składowych szlaku RANKL/RANK/OPG we krwi obwodowej u dzieci z SNP zmieniają się w czasie leczenia rhGH, co potwierdza wpływ leczenia rhGH na metabolizm kości.
2. Najistotniejsze zmiany podczas terapii preparatem rhGH, wyrażone zarówno w poprawie tempa wzrastania (HV, HV SDS), jak i w wynikach badań laboratoryjnych, obserwowano w ciągu pierwszych sześciu miesięcy leczenia.
3. Zwiększenie się stężeń OPG oraz fosfatazy alkalicznej w czasie obserwacji wskazuje na przewagę procesów kościotworzenia u dzieci z SNP.
4. Optymalne stężenie witaminy 25(OH)D3 podczas leczenia poprawia tempo wzrastania wyrażone zarówno w wartościach bezwzględnych (cm/rok), jak i w odniesieniu do populacji (HV SDS).
5. Istotne zmniejszenie się stężenia Ca i Mg w czasie terapii w porównaniu z wartościami wyjściowymi, może wskazywać na aktywne wbudowywanie tych pierwiastków do kości, a więc pośrednio na poprawę BMD.

Korzystając z przywileju i obowiązku recenzenta, oprócz uwag wyartykułowanych przeze mnie wyżej pragnę jeszcze dodatkowo zwrócić uwagę na pewne niedociągnięcia, których można by uniknąć przy przygotowaniu pracy do druku.

Tytuł pracy, który brzmi „Ocena roli szlaku RANKL/RANK/OPG u dzieci z somatotropinową niedoczynnością przysadki zakwalifikowanych do terapii rekombinowanym hormonem wzrostu” wskazuje na to, że badania są wykonywane u dzieci jeszcze nie leczonych, a tylko zakwalifikowanych do terapii. Dlatego lepiej byłoby napisać, że badanie dotyczy dzieci leczonych hormonem wzrostu, co automatycznie poszerzyłoby krąg badanych.

Szczegółowe cele pracy jakie sobie doktorantka założyła, tj. wpływ terapii na oznaczane parametry wydają się celami zbyt daleko sięgającymi. Niezwykle bowiem trudno jest oceniać wpływ terapii jakimś lekiem na cokolwiek, bez przeprowadzenia badań randomizowanych z podwójną ślepą próbą. Tak więc, z pewnością sformułowanie „wpływ” czy „efekt” leczenia jest niefortunnym określeniem. Bezpieczniej brzmiałby cel pracy jako np. „ocena czy analiza stężeń wybranych przez doktorantkę parametrów u dzieci z SNP przed- i w trakcie leczenia hormonem wzrostu”.

Według mnie wyniki badań można by było przedstawić według innej kolejności. Najpierw zaprezentować wyniki badań dzieci z grupy SNP przed wdrożeniem terapii GH porównując te wyniki do uzyskanych w grupie dzieci zdrowych, a dopiero później porównywać wyniki badań u dzieci z SNP przed- i w trakcie leczenia GH. To znacznie ułatwiłoby interpretację i zapamiętywanie uzyskanych wyników. Ponadto, według mnie nie ma konieczności powielania wyników w tabelach i równocześnie na wykresach. To zwiększa objętość pracy, ale nie wnosi dodatkowo nic merytorycznego. Uważam, że nie trzeba było wykonywać wykresów celem przedstawienia stężeń w surowicy krwi takich parametrów gospodarki wapniowo-fosforanowej, jak Ca, Mg, P, FA, tym bardziej, że średnie wartości tych badań mieściły się w granicach normy zarówno u dzieci z grupy badanej, jak i kontrolnej, czego nie podała doktorantka.

Dosyć często doktorantka niefortunnie używa słowa „dowodzi” (np. na str. 82, cyt. ...po włączeniu rhGH u dzieci z SNP stężenie RANKL obniża się, co dowodzi zwiększonej przebudowie kości” lub na stronie 84, cyt. „Zwiększenie stężenia OC w badanej grupie dzieci z SNP dowodzi poprawie mineralizacji kości”) zamiast np. „może wskazywać na”, bo wiemy, że jest bardzo wiele czynników wpływających na przebudowę kości i poprawę mineralizacji kośćca i nie da się dowieść tego na podstawie oznaczeń jednego parametru.

W dyskusji nie ma konieczności szczegółowego powtarzania wyników, przytaczając np. dane cyfrowe odnośnie istotności statystycznej czy wskaźników korelacji. Do tego służy rozdział poświęcony wynikom badań. Ponadto, w przypadku gdy wyniki mieszczą się na granicy istotności statystycznej, to nie trzeba ich omawiać. Lepiej bowiem skoncentrować się na ocenie i omówieniu najistotniejszych wyników.

Dyskusja zawiera mało informacji na temat oceny szlaku RANKL/RANK/osteoprotegeryna, mimo że to zagadnienie było zasadniczym celem przeprowadzonych przez doktorantkę badań. Sądzę jednak, że może to wynikać ze skąpej literatury w tym zakresie. Dlatego tym bardziej warto o tym napisać i ten aspekt szczególnie podkreślić w omówieniu, traktując brak możliwości odniesienia swoich wyników do wyników innych autorów jako ograniczenie pracy.

Przyjęło się, że wnioski powinny stanowić odpowiedź na cele badań. Według recenzenta należałoby je przeformułować. Przed przygotowaniem pracy do druku proponuję skrócić pierwszy wniosek do „Stężenia składowych szlaku RANKL/RANK/OPG we krwi obwodowej u dzieci z SNP zmieniają się w czasie leczenia rhGH” ew. napisać jak się zmieniają, ale wykreślić słowa, cyt. „co potwierdza wpływ leczenia rhGH na metabolizm kości”.

W pracy pojawiły się liczne błędy literowe i stylistyczne zarówno w samym tekście pracy, jak i w piśmiennictwie, na co z obowiązku recenzenta wskazuję. Jednak wszystkie przedstawione przeze mnie uwagi nie umniejszają merytorycznej wartości tej rozprawy doktorskiej.

W moim przekonaniu praca lekarz Moniki Seifert spełnia wymogi stawiane rozprawom na stopień doktora nauk medycznych. Jako recenzent będę oczekiwać na wyjaśnienia w formie ustnej w trakcie rozprawy doktorskiej.

Zwracam się zatem do Dziekana Wydziału Lekarskiego Kształcenia Podyplomowego Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu Pani Profesor dr hab.n.med. Joanny Rymaszewskiej o dopuszczenie lekarz Moniki Seifert do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Serdecznie dziękuję za przywilej recenzowania tej pracy.

Prof. dr hab. n. med. Katarzyna Ziara

33 686 78  
Prof. dr hab. n. med.  
Katarzyna Ziara  
Specjalista endokrynolog  
Specjalista chorób dzieci  
Częstochowa, ul. Siedlecka 9B  
tel. 601 494 048