



Białystok, 14.07.2023 r.

OCENA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

lekarz medycyny Magdaleny Katarzyny Maciejewskiej

pt. „Nowe biomarkery zaburzeń mikrokrążenia w twardzinie układowej”

Twardzina układowa (*Systemic Sclerosis - SSc*) jest autoimmunologiczną chorobą tkanki łącznej o przewlekłym i postępującym przebiegu, charakteryzującą się twardnieniem skóry i włóknieniem narządów wewnętrznych. Często prowadzi do niewydolności wielonarządowej, niepełnosprawności chorych i przyczynia się do znacznego obniżenia jakości życia. W rozwoju twardziny układowej ważną rolę odgrywają zaburzenia morfologii i funkcji drobnych naczyń krwionośnych, obecność procesu zapalnego, zaburzenia immunologiczne oraz nadmierna synteza kolagenu przyczyniająca się do włóknienia skóry i narządów wewnętrznych. Najwcześniejsze zmiany dotyczą uszkodzenia komórek śródbłonna i zaburzeń mikrokrążenia, które przyjmują szerokie spektrum objawów (m.in. objaw Raynauda, przełom nerkowy, nadciśnienie płucne). W SSc kluczowe jest wczesne rozpoznanie, ocena zajęcia procesem chorobowym narządów wewnętrznych, identyfikacja chorych z ryzykiem wystąpienia powikłań narządowych oraz zastosowanie optymalnej terapii. Dane z literatury wskazują, że ciągle trwają poszukiwania biomarkerów, które pozwolą na monitorowanie nasilenia choroby, rokowanie przebiegu choroby oraz ocenę odpowiedzi na leczenie. A ponieważ uszkodzenie mikrokrążenia występuje najwcześniej w rozwoju twardziny układowej, dlatego też uzasadnione jest zbadanie biomarkerów, związane z wpływem na budowę i funkcje naczynia. Stąd też niezwykle cenne jest poszerzenie wiedzy i podjęcie przez Doktorantkę badań dotyczących analizy zaburzeń mikrokrążenia oraz poszukiwanie nowych biomarkerów, które mogą pomóc w wyodrębnieniu pacjentów z

szybką progresją zmian naczyniowych i wysokim ryzykiem powikłań narządowych. Problematyka podjętych przez Doktorantkę badań jest nie tylko ciekawa i nowatorska, ale też niezwykle przydatna w praktyce klinicznej. Temat rozprawy doktorskiej uważam za trafny, doskonale wpisujący się w aktualny nurt współczesnych badań dotyczących twardziny układowej. Jest to niewątpliwa zasługa promotora - prof. dr hab. med. Lidii Rudnickiej, która jest niekwestionowanym autorytetem w dziedzinie badań nad patogenezą twardziny.

Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska stanowi cykl czterech spójnych tematycznie prac pełnotekstowych: dwóch przeglądowych i dwóch oryginalnych, opublikowanych w indeksowanych czasopismach naukowych. Łączny współczynnik wpływu „Impact Factor” publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej wynosi **14,077** punktów, a punktacja Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego - **410**. We wszystkich czterech publikacjach Doktorantka jest pierwszym autorem, co potwierdza Jej główny udział w przeprowadzeniu badań i przygotowaniu publikacji do druku oraz zostało potwierdzone pisemnymi oświadczeniami pozostałych autorów. Na przeprowadzenie badań uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej przy Warszawskim Uniwersytecie Medycznym.

Rozprawa doktorska składa się z następujących rozdziałów: wykaz stosowanych skrótów, streszczenie w języku polskim i angielskim, wstęp, założenia i cele pracy, kopie opublikowanych prac, omówienie publikacji stanowiących rozprawę doktorską, wnioski oraz spis piśmiennictwa. Dodatkowo dołączono kopię zgody Komisji Bioetycznej na przeprowadzenie badań oraz oświadczenia wszystkich współautorów publikacji. Rozprawa obejmuje łącznie 99 stron wydruku. We wstępie Doktorantka umiejętnie wprowadza czytelnika w problematykę przedmiotu badań własnych i przedstawia aktualny stan wiedzy dotyczący patogenezы twardziny układowej, koncentrując się na uszkodzeniu komórek śródbłónka i zaburzeniach mikrokrażenia oraz szczegółowo omawia analizowane biomarkery (koeptynę i czynnik indukowany hipoksją-1 α) wraz z uzasadnieniem ich wyboru.

Celem pracy lek. Magdaleny Maciejewskiej była analiza zaburzeń mikrokrażenia prowadzącego do objawu Raynauda i patologii nerek u pacjentów z twardziną układową oraz poszukiwanie nowych biomarkerów związanych z uszkodzeniem naczyń w przebiegu twardziny układowej. Wykorzystując zebrane dane Doktorantka postanowiła ocenić możliwość wykorzystania koeptyny i czynnika indukowanego hipoksją-1 α (HIF-1 α) jako potencjalnych biomarkerów zaburzeń mikrokrażenia w twardzinie układowej, a także potencjalną korelację między stężeniem koeptyny oraz HIF-1 α i aktywnością twardziny

układowej. Ponadto zaplanowała przeprowadzenie analizy wpływu leczenia reologicznego alprostadyłem na stężenie wybranych biomarkerów zaburzeń mikrokrążenia u pacjentów z twardziną układową.

Do badań przedstawionych w cyklu publikacji Doktorantka włączyła 50 pacjentów z rozpoznaną twardziną układową spełniających kryteria klasyfikacyjne ACR/EULAR. Grupę kontrolną stanowiło 30 zdrowych osób, dobranych pod względem płci i wieku. Doktorantka dokonała wnikliwej oceny stanu klinicznego wszystkich chorych z twardziną układową. Zajęcie narządowe oceniała według rekomendacji diagnostyczno-terapeutycznych Polskiego Towarzystwa Dermatologicznego. Zaburzenia naczyniowe oceniała na skórze gładkiej twarzy i kończyn (liczba i lokalizacja owrzodzeń paliczków, teleangiektazji). W celu oceny zaburzonego mikrokrążenia obwodowego u badanych pacjentów Doktorantka wykonywała badanie kapilaroskopowe. Zmiany kapilaroskopowe klasyfikowała wg wzoru Cutolo, dzieląc je na zmiany o typie wczesnym, aktywnym i późnym. Jako potencjalne biomarkery zaburzonego mikrokrążenia obwodowego oznaczała kopeptynę oraz czynnik indukowany hipoksją-1 α . Stężenia kopeptyny oraz czynnika indukowanego hipoksją-1 α w surowicy krwi oznaczono metodą immunoenzymatyczną (ELISA). Poziom istotności statystycznej przyjęto dla $p < 0,05$.

Wyniki przedstawiono w czterech publikacjach, których wartość naukowa została już potwierdzona pozytywnymi ocenami recenzentów odpowiednich czasopism:

1. **Chrabaszcz M.**, Małyszko J., Sikora M., Alda-Malicka R., Stochmal A., Matuszkiewicz-Rowińska J., Rudnicka L.: *Renal Involvement in Systemic Sclerosis: An Update*. Kidney Blood Press Res. 2020;45(4):532-548. (IF-2,687, MNiSW-70)
2. **Maciejewska M.**, Sikora M., Maciejewski C., Alda-Malicka R., Czuwara, J., Rudnicka L.: *Raynaud's phenomenon with focus on systemic sclerosis*. J. Clin. Med. 2022, 11, 2490. (IF-4,964, MNiSW-140)
3. **Maciejewska M.**, Stec A., Zaremba M., Maciejewski C., Rudnicka L., Sikora M.: *Copeptin as a biomarker of microcirculation alterations in systemic sclerosis*. Clin Cosmet Investig Dermatol. 2023;16:1351-1361. (IF-2.765, MNiSW-100)
4. **Maciejewska M.**, Sikora M., Stec A., Pawlik K., Zaremba M., Rudnicka L.: *Hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) as a biomarker for changes in microcirculation in individuals with systemic sclerosis*. Dermatol Ther (Heidelb) 2023 <https://doi.org/10.1007/s13555-023-00952-w> (IF-3,661, MNiSW-100)

Pierwsza praca (nr 1.) w cyklu stanowiącym podstawę do ubiegania się przez lek. Magdalenę Maciejewską o stopień doktora nauk medycznych, to praca przeglądowa, powstała we współpracy z Kliniką Nefrologii, Dializoterapii i Chorób Wewnętrznych Uniwersyteckiego Centrum Klinicznego w WUM, stanowiąca kompendium danych na temat manifestacji klinicznych zaburzonego mikrokrążenia u pacjentów z twardziną układową, do których zalicza się m.in. zaburzenia czynności nerek. Doktorantka zwróciła uwagę, że zaburzenia czynności nerek u pacjentów z twardziną układową mogą mieć różny obraz kliniczny i są poważnym czynnikiem pogarszającym rokowanie u tych chorych. Podkreśliła, że najbardziej specyficzną i najpoważniejszą chorobą nerek związaną z twardziną układową jest twardzinowy przełom nerkowy, który występuje u około 10% pacjentów. Pomimo, że leczenie twardzinowego przełomu nerkowego zostało zrewolucjonizowane przez wprowadzenie inhibitorów konwertazy angiotensyny, to jednak nadal połowa tych chorych wymaga dializoterapii, a śmiertelność wciąż jest wysoka. Doktorantka podkreśla, że wczesne rozpoznanie i leczenie nieprawidłowości naczyniowych w twardzinie układowej ma zasadnicze znaczenie dla poprawy wyników leczenia pacjentów i zapobiegania długotrwałym powikłaniom. Omawiana praca poglądowa podsumowuje aktualny stan wiedzy w zakresie zgłębianego przez Doktorantkę tematu oraz stanowi dobre wprowadzenie do podjętych przez Autorkę badań własnych.

Druga praca (nr 2.) z cyklu to również publikacja przeglądowa, w której Doktorantka dokonała skrupulatnego podsumowania aktualnej wiedzy na temat objawu Raynauda, który występuje u znacznej większości pacjentów z twardziną układową. Objaw ten może być jednym z najwcześniejszych symptomów twardziny układowej, niejednokrotnie wyprzedza pojawienie się innych cech SSc nawet o kilka lat. Doktorantka w swojej pracy podkreśla, że w celu oceny zaburzonego mikrokrążenia obwodowego u pacjentów z twardziną układową zawsze należy wykonać badanie kapilaroskopowe, które jest badaniem nieinwazyjnym i ma ogromne znaczenie w diagnostyce i różnicowaniu pierwotnego i wtórnego objawu Raynauda. Zwraca uwagę, że standardem jest klasyfikowanie zmian kapilaroskopowych wg wzoru Cutolo, dzieląc je na zmiany o typie wczesnym, aktywnym i późnym. Doktorantka podkreśla, że zmiany naczyniowe odzwierciedlają stopień zaawansowania twardziny układowej i pozwalają potwierdzić rozpoznanie, a następnie monitorować postęp choroby. Jest to ważna obserwacja, która ma istotne implikacje praktyczne.

Trzecia praca (nr 3.) z cyklu to z publikacja oryginalna, w której Doktorantka oznaczała stężenie kopeptyny (peptydu określającego aktywność układu wazopresynergicznego o właściwościach naczynioskurczowych) u pacjentów z twardziną układową. Przeprowadzona przez Doktorantkę analiza wyników wykazała, że pacjenci z twardziną układową mieli znacznie wyższe stężenie kopeptyny w osoczu w porównaniu do grupy kontrolnej ($p<0,01$). Autorka udokumentowała dodatnią korelację pomiędzy nasileniem objawu Raynauda a stężeniem kopeptyny ($r=0,801$, $p<0,05$). Zaobserwowała również, że pacjenci z „późnym” wzorcem zmian naczyniowych w kapilaroskopii charakteryzowali się wyższymi wartościami kopeptyny w porównaniu z pacjentami z „wczesnym” i „aktywnym” wzorcem ($p<0,05$). Doktorantka stwierdziła też, że pacjenci z twardziną układową u których występowały owrzodzenia paliczków palców mieli istotnie statystycznie wyższe stężenie kopeptyny niż pacjenci bez zmian skórnych ($p<0,05$). Podkreśliła, że dożylne leczenie analogami prostaglandyn (alprostacyl) powodowało zmniejszenie stężenia kopeptyny po 4-6 cyklach podawania ($p<0,01$). Na tej podstawie Doktorantka wyciągnęła wnioski, że kopeptyna wydaje się być obiecującym biomarkerem uszkodzenia naczyniowego w twardzinie układowej i odpowiedzi na leczenie poprawiające właściwości reologiczne krwi, a dalsze badania nad kopeptyną mogą przyczynić się do identyfikacji pacjentów o szybko postępujących zmianach naczyniowych i wysokim ryzyku powstania owrzodzeń palców. Obserwacja ta w przyszłości ma szansę mieć istotne znaczenie kliniczne.

Czwarta praca (nr 4.) z cyklu to druga publikacja oryginalna w której Doktorantka określiła związek pomiędzy stężeniem czynnika indukowanego hipoksją-1 α u pacjentów z twardziną układową a aktywnością choroby i nasileniem zaburzeń mikrokrążenia obwodowego. Ponadto dokonała oceny klinicznej zajęcia naczyń krwionośnych poprzez ocenę nasilenia objawu Raynauda w skali Raynaud's Condition Score (RCS), ocenę występowania czynnych i zagojonych owrzodzeń paliczków i teleangiektazji. Każdy pacjent miał wykonane również badanie kapilaroskopowe wału paznokciowego oceniane w skali Cutolo. Aktywność choroby oceniono za pomocą wskaźnika EUSTAR Revised Activity Index. Podsumowując badania Doktorantka podkreśliła, że pacjenci z twardziną układową mieli istotnie statystycznie wyższe stężenie czynnika indukowanego hipoksją-1 α w porównaniu z grupą kontrolną ($p<0,01$). Natomiast pacjenci z uogólnioną postacią twardziny układowej i formą ograniczoną wykazywali zwiększone stężenie czynnika indukowanego hipoksją-1 α w porównaniu z grupą kontrolną ($p<0,01$). Zaobserwowała również statystycznie wyższe stężenie czynnika indukowanego hipoksją-1 α u pacjentów z „aktywnym”

kapilaroskopowym obrazem twardzinowym wg klasyfikacji Cutolo w porównaniu z pacjentami z obrazem „wczesnym” ($p < 0,05$) i „późnym” ($p < 0,05$). Jednocześnie udokumentowała, że pacjenci, u których nie występowały owrzodzenia paliczków palców mieli znacząco wyższe stężenie czynnika indukowanego hipoksją-1 α w porównaniu do pacjentów z aktywnymi owrzodzeniami paliczków palców ($p < 0,05$) oraz owrzodzeniami paliczków palców w przeszłości ($p < 0,05$). Biorąc pod uwagę plejotropowe działanie czynnika indukowanego hipoksją-1 α w twardzinie układowej, m.in. wpływ na angiogenezę, proliferację i akumulację włókien macierzy zewnątrzkomórkowej, wyniki badań Doktorantki mogą przyczynić się do znalezienia biomarkera pozwalającego monitorować aktywność twardziny układowej, ocenić rokowanie i przewidzieć odpowiedź na leczenie.

W oparciu o przeprowadzone badania lek. Magdalena Maciejewska wyciągnęła cztery istotne wnioski, które są zgodne z uzyskanymi wynikami oraz odpowiadają postawionym przez Autorkę celom rozprawy:

1. Kopeptyna i czynnik indukowany hipoksją-1 α (HIF-1 α) mogą posłużyć jako potencjalne biomarkery zaburzeń mikrokrażenia obwodowego u pacjentów z twardziną układową.
2. Stężenie kopeptyny w surowicy wykazuje pozytywną korelację z nasileniem objawu Raynauda i występowaniem owrzodzeń obwodowych w przebiegu twardziny układowej oraz jest czułym parametrem odpowiedzi na leczenie reologiczne.
3. Stwierdzono statystycznie wyższe stężenie czynnika indukowanego hipoksją-1 α w surowicy u pacjentów z „aktywnym” kapilaroskopowym obrazem twardzinowym wg klasyfikacji Cutolo w porównaniu z pacjentami z obrazem „wczesnym” i „późnym”.
4. Monitorowanie stężenia kopeptyny i czynnika indukowanego hipoksją-1 α u pacjentów z twardziną układową może pozwolić na identyfikację pacjentów o wysokim ryzyku nasilonych zaburzeń mikrokrażenia i tym samym wczesnego rozpoczęcia intensywnego leczenia reologicznego.

Każdy z wniosków jest przydatny klinicznie, zarówno w procesie diagnostycznym jak i terapeutycznym. Wskazują one jak istotnym i złożonym problemem jest zaburzenie mikrokrażenia obwodowego u pacjentów z twardziną układową oraz jak ważne jest poszukiwanie odpowiednich biomarkerów, które mogą pomóc w identyfikacji pacjentów z

szybką progresją zmian naczyniowych i wysokim ryzykiem powikłań narządowych. Z kolei wczesne wdrożenie leczenia naczyniowego i immunosupresyjnego jeszcze na etapie subklinicznym, znacząco poprawiłoby skuteczność terapii i rokowanie u tych pacjentów.

Podsumowując, rozprawę doktorską lekarz medycyny Magdaleny Maciejewskiej oceniam bardzo wysoko z uwagi na ważność podjętego tematu badań oraz znaczenie praktyczne uzyskanych wyników. Udział Doktorantki w powstawaniu prac był znaczący, co podkreśla fakt bycia przez nią pierwszym autorem wszystkich publikacji. Wszystkie cztery publikacje wchodzące w skład rozprawy doktorskiej są spójne tematycznie, właściwie udokumentowane i zilustrowane. Na uwagę zasługuje opublikowanie własnych wyników badań oraz prac przeglądowych w wiodących, wysokopunktowanych czasopismach naukowych, co dodatkowo podkreśla ważność podejmowanego zagadnienia i wymierny aspekt praktyczny uzyskanych wyników. Doktorantka wykazała się dużą znajomością problematyki stanowiącej przedmiot rozprawy, zrealizowała założone cele badawcze, poprawnie dobrała i zastosowała metody badawcze i analizy statystyczne, umiejętnie zinterpretowała uzyskane wyniki oraz logicznie sformułowała wnioski wynikające z przeprowadzonych badań. Piśmiennictwo we wszystkich publikacjach jest dobrze wyselekcjonowane i właściwie dobrane do własnego materiału, co świadczy o dobrej znajomości tematu i umiejętności posługiwania się literaturą naukową. Całość pracy wskazuje, że Doktorantka posiada odpowiednie umiejętności potrzebne do rozwiązywania problemów naukowych i jest dobrze przygotowana do prowadzenia dalszych prac badawczych.

Na podstawie powyżej przedstawionych danych, z pełnym przekonaniem stwierdzam, że przedłożona mi do oceny **rozprawa doktorska lekarz medycyny Magdaleny Maciejewskiej pt. „Nowe biomarkery zaburzeń mikrokrążenia w twardzinie układowej”** spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. **Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2018 poz. 1668)**. Mam więc zaszczyt przedłożyć Radzie Dyscypliny Nauk Medycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego moją pozytywną ocenę rozprawy wraz z wnioskiem o dopuszczenie lekarz medycyny Magdaleny Katarzyny Maciejewskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie ze względu na wysoką wartość merytoryczną rozprawy, rzetelność przeprowadzonych analiz, wartość poznawczą oraz fakt opublikowania wyników badań w wiodących czasopismach naukowych (IF=14,007), zwracam się do Rady Dyscypliny Nauk

Medycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego z wnioskiem o wyróżnienie
rozprawy doktorskiej lekarz Magdaleny Maciejewskiej.

prof. dr hab. n. med. Iwona Flisiak

K I E R O W N I K
Kliniki Dermatologii i Wenerologii

prof. dr hab. n. med. Iwona Flisiak