



Dr hab.n.med. Henryk Mazurek
Klinika Pneumonologii i Mukowiscydozy
Oddział Terenowy IGiChP
34-700 Rabka – Zdrój
Ul. Prof. Rudnika 3b

RECENZJA

rozprawy doktorskiej lekarza Justyny Milczewskiej

pt. "Zakażenia krzyżowe dróg oddechowych o etiologii *Pseudomonas aeruginosa* u dzieci chorujących na mukowiscydozę"

Zakażenia bakteryjne odgrywają ogromną rolę w progresji przewlekłej choroby oskrzelowo – płucnej w przebiegu mukowiscydozy. Szczególne znaczenia ma zakażenie pałeczką ropy błękitnej, a szczególnie jego przejście w postać przewlekłą, które wiąże się z przyspieszeniem nieodwracalnej degradacji układu oddechowego. Uszkodzenie układu oddechowego związane z przewlekłą infekcją oskrzelowo - płucną spowodowana przez *Pseudomonas aeruginosa* jest główną przyczyną chorobowości w mukowiscydozie i prowadzi do wielu niekorzystnych następstw, jak szybsze pogarszanie się wskaźników czynności płuc, zwiększona częstość zaostrzeń wymagających kuracji antybiotykiem i / lub hospitalizacji, wolniejszy wzrost chorych w wieku rozwojowym.

Choć większość szczepów pałeczki ropy błękitnej jest nabywana z naturalnego otoczenia chorego, od lat rośnie świadomość – zarówno wśród chorych jak i personelu medycznego – że część szczepów pochodzi od innych chorych. Co gorsza, istnieje ryzyko, że nabywane od innych chorych szczepy są bardziej zjadliwe i / lub bardziej odporne na antybiotyki niż szczepy dzikie.

W tym kontekście **wybór tematu pracy doktorskiej** przez Panią **Justyną Milczewską** należy ocenić pozytywnie, jako trafny w aspekcie zarówno poznawczym jak i praktycznym. Podjęcie tematu przez lek. Justynę Milczewską

dokonane w pracy doktorskiej, stwarza szansę na istotne pogłębienie wiedzy tym w zakresie.

Tytuł pracy precyzyjnie oddaje jej treść.

I. Ocena formy pracy

Skrypt pracy lek. **Justyny Milczewskiej** na stopień doktora nauk medycznych składa się ze 112 stron tekstu zasadniczego, podzielonego na główne rozdziały w sposób obowiązujący w opracowaniach naukowych, tj.: *Wstęp – Cel i założenia pracy – Pacjenci i metodyka pracy – Wyniki – Dyskusja – Wnioski*, co jest przejrzyste zestawione w *Spisie treści*. Dodatkowo znajdujemy umieszczony na początku *Wykaz stosowanych skrótów*. *Wykaz Piśmiennictwa* stanowiący zestawienie 200 pozycji, zarówno obcojęzycznych jak i uwzględnionych publikacji krajowych, ułożony jest w kolejności przywoływania w tekście pracy. Ponadto w pracy znajdują się 45 tabel i 7 rycin, umieszczonych w tekście pracy w sposób ciągły. *Streszczenie* stanowi uzupełnienie tekstu dysertacji, reasumując najistotniejsze elementy opracowania (podobnie jak umieszczone po nim *Summary* w języku angielskim). Ponadto w *Załącznikach* znajdujemy zestawienie numerów badanych szczepów bakteryjnych (wraz ich przynależnością do grup klonalnych i inicjałami chorych, od których zostały wyizolowane) oraz dendrogram ich podobieństwa genetycznego.

Bardzo obszerny *Wstęp* sprawnie wprowadza w przedstawiane zagadnienie i daje sposobność do racjonalnego wyводу celu badania. Jego długość wynosi 21% całej pracy.

Cel badania jest przedstawiony w formie pięciu hipotez roboczych, po których pojawia się ogólny cel pracy i 5 celów szczegółowych, wymienionych w punktach.

Przykładnie treściwy a zarazem dostatecznie szczegółowy jest opis badanych *Pacjentów i metodyki badań*, zajmujący 13% pracy. Prezentacja *Wyników* zajmuje 37% pracy, a następująca po nich *Dyskusja* jest nieco krótsza (27%) od wyników, ale nie w stopniu budzącym formalne zastrzeżenia. Rozdziały główne pracy są podzielone na podrozdziały, co znacznie zwiększa przejrzystość prezentacji.

Wnioski stanowią ogólną odpowiedź na szczegółowe pytania wymienione w celu pracy, przy czym ich liczba nie koresponduje z liczbą celów szczegółowych, co utrudnia odpowiedź na pytanie, czy udało się znaleźć na nie odpowiedź.

Streszczenie ułatwia szybkie zapoznanie się z najistotniejszymi fragmentami treści pracy, przed przystąpieniem do uważnego jej studiowania. Nic co ważne w pracy nie zostało w tym streszczeniu pominięte.

Zestawione w *Piśmiennictwie* pozycje są cytowane w stosownych fragmentach tekstu, co świadczy o ich rzeczywistym wykorzystaniu.

W zewnętrznej ocenie formy skryptu doktorskiego z przyjemnością można pochwalić jego przejrzysty układ oraz staranne wydanie pracy. Tabele i ryciny są umieszczone w strumieniu tekstu, co ułatwia zapoznavanie się z pracą.

II. Ocena merytoryczna pracy.

Większość skrótów użytych w tekście pracy jest opisana przy użyciu po raz pierwszy, a zastosowane w skróty są zgodne z obowiązującą terminologią.

Rozważania we *Wstępie* przedstawiają omówienie podstawowych informacji na temat mukowiscydozy oraz głównych obserwacji dotyczących epidemiologii zakażeń wywołanych przez pałeczkę ropy błękitnej. W ferworze pracy pojawiły się pojedyncze przejęzyczenia, jak np. sformułowanie o całkowitej utracie funkcji białka CFTR u osób posiadających mutacje klas I – III na str.13, z czym można co najmniej polemizować (zwłaszcza u osób mających tylko mutacje klasy III). Podobnie liczba podawanych gatunków *Burkholderia cepacia complex* jako 11 wydaje się zaniżona, skoro w artykule pod egidą FDA pochodzącym z tego samego roku (2011) co przywołana pozycja 31 wymieniano ich 17 (Torbeck L, Raccasi D, Guifoyle DE et al. *Burkholderia cepacia: this decision is overdue*. PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology 2011; 65: 535 – 543). Analogicznie, na str.21 przy omawianiu zasad rozpoznawania mukowiscydozy brak zaznaczenia, że dla ustalenia rozpoznania konieczne jest stwierdzenie obecności dwóch **prowadzących do choroby** mutacji *CFTR*. Autorka we *Wstępie* opisuje również zasady leczenia mukowiscydozy (co chyba nie było niezbędne) i zapewne konieczność skrótowego przedstawienia spowodowała, że brak niektórych niuansów, jak np. zaznaczenia, że

choć drenaż oskrzeli powinien być wykonany po 6 – 8 godzinach od inhalacji dornazy, minimalny odstęp czasu wynosi 30 min. [van Der Griesse L. *Does the timing of inhaled dornase alfa matter?* Journal of Cystic Fibrosis 2009; 8 (suppl.1): S6 – S9]. Na str.27 Autorka podaje, że *Ps.aeruginosa* występuje w powietrzu, ale wydaje się, że warto doprecyzować, że jest to tylko czasowe występowanie po aerolizacji zanieczyszczonej wody lub składników stałych.

Mimo tych drobnych nieścisłości na tle tych rozważań uzasadniony jest *Cel badania*, z wyróżnieniem przez Autorkę 5 celów szczegółowych, opisujących gruntownie wszystkie zaplanowane analizy.

Lekarz Justyna Milczewska podjęła się próby rozwiązania zawartego w tytule pracy problemu w oparciu o analizę wyników zaprojektowanego i zrealizowanego przez siebie badania, co przedstawiła w opisie *Pacjentów i metodyki badań*. Autorka zbadała 75 chorych na mukowiscydozę, od których w czasie trwania badania (2011-12) wyhodowano pałeczkę ropy błękitnej i które poddano typowaniu genetycznemu. U badanych został wykonany komplet badań, obejmujących szczegółowe wywiady, badanie lekarskie, badania dodatkowe. W szczególności, prześledzono wspólne kontakty oraz okresy hospitalizacji pacjentów. Opis zastosowanych metod do statystycznej analizy danych jest zwięzły, ale precyzyjny. Zastosowane przez Autorkę metody statystyczne są należycie dobrane, a wyniki analiz przedstawione czytelnie. Podawane w tym rozdziale na str.39 zależności liczby szczepów wyizolowanych od chorego od czynników klinicznych i laboratoryjnych należą raczej do wyników i zapewne przez przypadek zostały tu umieszczone. Na str.47 i następnych wskaźnik MEF25/75 Autorka określa jako „maksymalny przepływ wydechowy pomiędzy wartościami, gdy 25% a 75% FVC pozostało do wydmuchnięcia” podczas gdy w języku polskim od lat sześćdziesiątych ubiegłego wieku jest nazywany przepływem w środku wydechu lub przepływem środkowo – wydechowym (Cotes JE *Czynność płuc*. PZWL Warszawa 1969). Z kolei na str.48: Autorka podaje wzory Knudsona na wyliczanie wartości należnej FEV1, natomiast brak wzoru Hankinsona dla wyliczenia przepływu środkowo – wydechowego, którego logicznie należałoby tu oczekiwać. Niedosyt budzi brak informacji, czy wyliczane na str.48 badania były wykonywane u wszystkich chorych, czy tylko w przypadku podejrzenia klinicznego.

Szczegółowa analiza i przedstawienie wyników stanowi zasadniczą część dysertacji. W rozdziale *Wyniki* Autorka opisuje, że od badanych chorych wyhodowano 170 szczepów *Pseudomonas aeruginosa*, które poddano analizie podobieństwa genetycznego metodą REA-PFGE, wyodrębniając 24 grupy klonalne. W największej (grupa nr 19) uwzględniono 49 (28,8%) szczepów, pochodzących od 21 (28,0%) pacjentów. Kolejna liczbowo grupa składała się z 12 (7,1%) izolatów od 7 (9,3%) chorych. Od dwóch chorych wyhodowano szczepy należące do obydwu wymienionych grup. Co ciekawe, aż 37 szczepów (od 24 chorych) nie wykazywało podobieństwa genetycznego do innych izolatów. U 26 pacjentów grup 18 i 19 łączny czas hospitalizacji (i antybiotykoterapii dożylniej) był dłuższy niż u pozostałych chorych. W tej grupie mediana FEV1 wyniosła 69,5% wartości należnej, co było wartością znamienne niższą niż uzyskana u 49 pacjentów zakażonych „szczepami własnymi” (87%). Chorych zakażonych spokrewnionymi szczepami cechował starszy wiek, gorsza punktacja w skali Shwachmana-Kulczyckiego i w skali Brasfield, mniejsza masa ciała i większa częstość przewlekłego zakażenia pałeczka ropy błękitnej.

Z obowiązku recenzenta zwrócę uwagę, że niewłaściwe jest wyliczanie odsetek w grupie liczącej 2 chorych (str. 67 i kolejne). Nie znalazłem też informacji, ilu chorych miało FEV1<30% wn, o której Autorka wspomina na stronie 69.

Zwięzła *Dyskusja* stanowi omówienie własnych spostrzeżeń, w porównaniu z dostępnymi danymi z literatury medycznej przedmiotu. Rozpoczyna się przypomnieniem informacji o szczepach epidemicznych, po części dublując informacje ze wstępu (np. str. 94 – 95 vs. 32 – 33). Dalej Autorka przedstawia możliwe interpretacje uzyskanych wyników, zwracając uwagę na liczne przyczyny rozbieżności wyników uzyskiwanych przez różnych autorów. Autorka analizuje możliwe drogi transmisji szczepów pomiędzy chorymi, wspierając argumentację danymi z piśmiennictwa. Następnie na str. od 114 do 123 przedstawia ewolucję poglądów na temat zakażeń krzyżowych oraz potrzeby izolacji, przedstawiając też ich implementację we własnym ośrodku.

Autorka słusznie wywnioskowała, że pokrewieństwo genetyczne części izolowanych mogło wynikać z zakażeń krzyżowych, do czego z kolei mógł się

przyczyniać brak właściwej izolacji chorych. Konsekwencją był gorszy stan kliniczny tych chorych. Dalsze wnioski są raczej sugestiami, gdyż nie wiążą się bezpośrednio z wynikami badania. Szczególnie ważny postulat dotyczy potrzeby dalszych działań dla ograniczania transmisji zakażeń. Potwierdza to doniesienia innych autorów na ten temat oraz uzasadnia celowość dalszych badań tego zagadnienia.

Spośród cytowanych 200 pozycji z lat 1905 – 2016, około 70 pozycji zostało opublikowanych w latach 2010 – 2016. Przeprowadzone rozumowanie jest przekonujące, a dyskusja z innymi badaczami dokonywana logicznie i z dużą swobodą, co świadczy o dogłębnej znajomości naukowych podstaw zagadnienia i nabyciu umiejętności krytycznego rozumowania.

Najistotniejsze dla mnie zdecydowanie jest jednak wykazanie przez Panią **Justynę Milczewską** związku zakażeń wywołanych przez spokrewnione genetycznie szczepy z obecnością zachowań, które takiej transmisji mogły sprzyjać. W kontekście nielicznych danych na temat częstości zakażeń krzyżowych (oraz zakażeń szpitalnych) w Polsce jest to szczególnie ważna obserwacja.

Warto podkreślić krytyczne podejście Autorki do tematu oraz odwagę mówienia o potencjalnych czynnikach, które mogły zakażeniom sprzyjać jak ograniczenia lokalowe czy organizacyjne.

Wyniki Pani **Justyny Milczewskiej** mają duże znaczenie poznawcze. Rzetelnie wykonane opracowanie przyniosło ważne spostrzeżenia na temat częstości występowania zakażeń u polskich chorych na mukowiscydozę. Ważną obserwacją jest brak spodziewanego w oparciu literaturę prostego związku zakażeń krzyżowych z przebiegiem choroby.

Przedstawione szczegółowo wyniki badań, mogą być niewątpliwie wykorzystane w praktyce. Autorka słusznie zwraca uwagę na ważne praktyczne problemy, jak potrzeba wprowadzenie w życie funkcjonujących w innych krajach zasad zapobiegania zakażeniom. Elementy te wskazują zarówno na potrzebę zmian organizacyjnych, jak też potrzebę edukacji – w tym kierowanej do lekarzy zajmujących się mukowiscydozą oraz samych chorych.

Z obowiązku recenzenta chciałbym zwrócić uwagę na to że mimo widocznej staranności przy opracowaniu edycji tekstu, zdarzają się nieliczne błędy literowe (np. na str.15, 69 czy 117). Znajdujemy też powtórzenia fragmentów tekstu – na str. 61 znajdujemy tekst występujący uprzednio na str.49, a na str. 69 powtórzoną klasyfikację zaburzeń czynnościowych ze str.48.

Wspomniane niewielkie usterki redakcyjne w żaden sposób nie umniejszają merytorycznej wartości pracy doktorskiej Pani Justyny Milczewskiej. Uważam, że lekarz **Justyna Milczewska** w przedstawionej dysertacji doktorskiej wykazała dobre przygotowanie do pracy naukowej i dowiodła posiadania umiejętności samodzielnego rozwiązywania zagadnień. Nieliczne zastrzeżenia dotyczą szczegółów redakcji pracy łatwych do skorygowania, lub które mogą być wyjaśnione w trakcie obrony pracy. Praca lekarz Justyny Milczewskiej zatytułowana „*Zakażenia krzyżowe dróg oddechowych o etiologii *Pseudomonas aeruginosa* u dzieci chorujących na mukowiscydozę*” jest przeze mnie oceniona pozytywnie, ponieważ wnosi informacje ważne dla nauki i praktyki klinicznej, ale również recenzowana rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art.13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. z 2015 r., poz. 249). Przedstawione unikalne wyniki tych badań niewątpliwie zasługują na publikację, do czego doktorantkę zachęcam.

Z wymienionych przyczyn **przedkładam Wysokiej Radzie Naukowej Instytutu Matki i Dziecka w Warszawie wniosek o dopuszczenie lekarz Justynę Milczewską do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

Dr hab.n.med. Henryk Mazurek, prof. nadzw.

Kierownik Kliniki Pneumonologii i Mukowiscydozy
ZP IGiChP w Rabce – Zdrój