



INSTYTUT PSYCHIATRII I NEUROLOGII II KLINIKA NEUROLOGICZNA

Kierownik: Prof. dr hab. med. Iwona Kurkowska-Jastrzębska

e-mail: ikurkowska@ipin.edu.pl



ul. Sobieskiego 9

tel. 842 76 83, 642 66 11 wew. 237

02-957 WARSZAWA

fax. 842 40 23 lub 642 53 75

Recenzja rozprawy na stopień doktora nauk medycznych lekarz Marty Piaścik-Gromady

pt: „Ocena stężenia osteoprotegeryny w surowicy krwi pacjentów z chorobą Parkinsona.”

Problem badawczy

Doktorantka podejmuje się oceny jednego z białek biorących udział w metabolizmie kości – osteoprotegeryny u chorych z chorobą Parkinsona. W chorobie Parkinsona częstość występowania osteoporozy jest większa niż w równoległej populacji ogólnej, dlatego podjęcie tematu jest uzasadnione zarówno od strony poznawczej jak i być może praktycznej, jakim byłoby poszukiwanie biomarkera związanego z postępem niesprawności i zaawansowania choroby. Osteoprotegeryna (OPG) została pierwotnie zidentyfikowana jako inhibitor osteoklastogenezy, który działa poprzez łączenie się z ligandem aktywatora receptora czynnika jądrowego kappa B (Receptor Activator of Nuclear factor Kappa B Ligand- RANKL) w tkance kostnej. OPG wydzielana jako rozpuszczalny receptor wiąże RANKL i tym samym uniemożliwia jego przyłączenie do receptora RANK. Sygnalizacja RANKL / RANK reguluje tworzenie wielojądrzastych osteoklastów z ich prekursorów, a także ich aktywację i przeżycie w stanach fizjologicznej przebudowy kości i w różnych stanach patologicznych. Wykazano, że poziom OPG rośnie w chorobach zapalnych kości (np. reumatoidalnym zapaleniu stawów¹) oraz w osteoporozie². Sygnalizacja RANK/RANKL obok kości jest również ważna dla innych narządów np. przebudowy węzłów chłonnych, gruczołu mlekowego, guzów nowotworowych oraz dla

¹ Wang P, Li S, Liu LN, Lv TT, et al. Circulating osteoprotegerin levels are elevated in rheumatoid arthritis: a systematic review and meta-analysis Clin Rheumatol. 2017 ;36(10):2193-2200.

² Theoleyre S, Wittrant Y, Tat SK et al. The molecular triad OPG/RANKL/RANKL: involvement in the orchestration of pathophysiological bone remodeling. Cytokine Growth Factor Rev 2004; 15: 457-75.

naczyń. OPG jest wydzielana przez wiele komórek i może regulować procesy zapalne, dlatego być może pełni znacznie szerszą rolę niż dotychczas poznane. Sugeruje się jej rolę w chorobach naczyniowych (min. regulacja tworzenia zwapnień w ścianie naczyń) ponieważ jest wydzielana i uwalniana z komórek śródbłonna naczyniowego w odpowiedzi na bodźce zapalne. OPG może być markerem uszkodzenia naczyń, a jej stężenie w osoczu koreluje z ryzykiem zarówno śmiertelności ogólnej jak i śmiertelności sercowo-naczyniowej. Dlatego problem podjęty przez doktorantkę jest uzasadniony, ciekawy i ważny dla poznania dodatkowych czynników wpływających na przebieg choroby Parkinsona. Dodatkowo jest to jedna z pierwszych prac pokazujących to zagadnienie w chorobie Parkinsona³.

Strona formalna rozprawy

Przedstawiona do oceny praca została wykonana w Klinice Neurologii i Epileptologii Centrum Medycznego Kształcenia Podyplomowego w Warszawie pod kierunkiem Pani prof. dr hab. n med. Urszuli Fiszer. Ma typowy układ, liczy 105 stron, jest podzielona na 14 rozdziałów, zawiera 6 tabel, 13 rycin i odwołuje się do 306 pozycji piśmiennictwa.

Dobór piśmiennictwa jest trafny i zawiera wystarczającą liczbę pozycji pozwalającą na omówienie tematu rozprawy.

Strona merytoryczna rozprawy

We wstępie omówiona jest patogeneza choroby Parkinsona, epidemiologia, obraz kliniczny i metody leczenia. Rozdział jest opracowany poprawnie i nie mam znaczących uwag co do merytorycznej zawartości przedstawionych rozdziałów. Doktorantka również omawia potencjalny związek choroby Parkinsona i chorób naczyniowych mózgu, oraz dokładnie budowę i mechanizm działania osteoprotegeryny.

Bardziej obszerne rozdziały opisują zmiany naczyniowe w mózgu i ich związek z idiopatyczną chorobą Parkinsona oraz problem osteoporozy, zwracając uwagę na brak pełnej oceny tego problemu. Osteoporoza w chorobie Parkinsona wynika z wielu czynników, częściowo z mniejszej aktywności fizycznej i ostatecznie unieruchomienia pacjentów, niedożywienia oraz niedoboru witaminy D3. Może w tym procesie brać udział zarówno stosowana w leczeniu lewodopa stymulująca wydzielanie homocysteiny i spadek masy kości oraz białka bezpośrednio zaangażowane w budowę kości. Jednym z białek regulujących osteogenezę jest osteoprotegeryna receptor hamujący osteoklasty. W rozdziale tym Doktorantka opisuje dokładnie budowę i funkcję osteoprotegeryny zarówno w metabolizmie

³ Alrafiah A, Al-Ofi E, Obaid MT, Alsomali N. Assessment of the Levels of Level of Biomarkers of Bone Matrix Glycoproteins and Inflammatory Cytokines from Saudi Parkinson Patients. Biomed Res Int. 2019 May 8;2019:2690205.

kości, ale również w innych procesach. Jednym z ważnych funkcji osteoprotegeryny jest wpływ na śródbłonek naczyń, sugeruje się jej wpływ na proces miażdżycowy, jej poziom jest podwyższony w chorobach naczyniowych mózgu i po udarze mózgu.

Cel pracy – ocena stężenia OPG w surowicy krwi osób z chorobą Parkinsona z różnym zaawansowaniem choroby, oraz ocena związku pomiędzy stężeniem OPG a wybranymi wskaźnikami gospodarki wapniowej i czynnikami ryzyka chorób naczyniowych mózgu jest celem podstawowym. Obok tego równorzędnie doktorantka formułuje podobny cel dla drugiej grupy chorych – po udarze niedokrwiennym mózgu, która jest traktowana słusznie jak grupa kontrolna i w której należy spodziewać się wysokiego stosunkowo poziomu osteoprotegeryny.

Materiał i metody stosowane w pracy są dobrze i szczegółowo opisane. Należy podkreślić, że grupy badane zostały dobrze dobrane pod względem wieku i płci co mimo ich niedużej liczebności pozwala na wiarygodne dokonanie porównań.

Dokładnie opisana jest grupa chorych z chorobą Parkinsona, nie wiadomo jednak w jakim czasie od udaru niedokrwiennego była pobierana krew na wykonywanie oznaczeń; nie wiemy także ze wstępu, czy poziom osteoprotegeryny zmienia się w przebiegu udaru. Jako białko ostrej fazy OPG powinna być indukowana po udarze i jej poziom powinien zmieniać się w czasie, dlatego ważne jest aby odnieść się do tej kwestii i sprecyzować kiedy dokonywano pomiaru. W chorobie Parkinsona, która jest chorobą przewlekłą takie wymagania nie są oczywiście stawiane. Dla porządku powinno być również zaznaczone, że chorzy z chorobą Parkinsona nie przebyli w przeszłości udaru mózgu.

Opis metod biochemicznych oznaczania poszczególnych badanych wskaźników jest wyczerpujący i chyba za obszerny ponieważ były to (słusznie) metody rutynowe oznaczania tych wskaźników, w mojej ocenie wystarczyłoby podać nazwę stosowanej metody. Jeśli doktorantka wykonywała samodzielnie, któreś z oznaczeń powinno to być zaznaczone.

Wyniki badań są przedstawione w wyczerpujący sposób, dokładnie i szczegółowo opisane. Doktorantka dołączyła również wykresy i tabele dokumentujące opisywane dane. Przedstawiono również korelacje poszczególnych wskaźników w poszczególnych grupach pacjentów. W grupie kontrolnej pomyłono jednak ryciny pokazujące korelacje PTH z OPG i OPG z witaminą D3 ponieważ przedstawione ryciny pokazują dokładnie odwrotne do opisywanych zależności.

Wyniki analizy regresji przedstawione są również w sposób jasny i przejrzysty, ale pytania budzi niedoprecyzowanie jakie zmienne były brane pod uwagę przy badaniu ich wpływu na poziom OPG. Zmienne powinny być opisane przy każdej grupie badanej ponieważ mogły się różnić między sobą. Dodatkowo w pierwszym zdaniu Doktorantka pisze: „Aby wyjaśnić jaka istnieje zależność między

jakością życia chorych, a korelującymi z nią w sposób istotny statystycznie czynnikami chcąc jednocześnie uwzględnić łączne działanie tych czynników użyto...” W pracy nie badano jakości życia chorych a analizy regresji użyto do badania wpływu badanych wskaźników na poziom OPG. Tak samo wśród zmiennych niezależnych branych pod uwagę wymieniono nasilenie zaburzeń czynności poznawczych, których nie oceniano w obecnej pracy.

Dyskusja wyników

Dyskusję prowadzi Doktorantka początkowo w odniesieniu do osteoprotegeryny jako wskaźnika reakcji zapalnej mogącej mieć istotne znaczenie w chorobie Parkinsona. Doktorantka opisuje dokładnie rolę komórek glejowych, wydzielane przez nie cytokiny i możliwy wpływ tej reakcji na progresję choroby Parkinsona, a być może udział jej w patogenezie choroby. Natomiast w ogóle nie ma odniesienia opisanej reakcji w mózgu do OPG. Związki pomiędzy OPG badaną na obwodzie, a powolną reakcją zapalną w mózgu u chorych nie zostały w ogóle zaznaczone oprócz stwierdzenia, że OPG jest białkiem ostrej fazy. Doktorantka nie odnosi się do żadnych badań dokumentujących możliwość wpływu OPG na glej, barierę krew-mózg, poziom cytokin prozapalnych lub nie pisze, że nie ma takich badań. Chciałabym nadmienić, że choć OPG może działać ochronnie na śródbłonek i przeciwdziałać miażdżycy (ogólnie rzecz ujmując) to wysokie poziomy OPG w modelach udaru niedokrwienego u myszy wiążą się z większym obszarem martwicy i gorszym przebiegiem. Sama Doktorantka pisze że poziom OPG jest predyktorem większej śmiertelności w udarze. Sygnalizacja RANKL / RANK (hamowana przez OPG) wykazuje działanie neuroprotektoryjne poprzez zmniejszanie produkcji cytokin zapalnych przez glej w mieszanej hodowli neuron-glej. Tym samym OPG zwiększałaby stan zapalny hamując RANKL/RANK. Pokazano również, że sygnalizacja RANK jest ważna dla modulowania aktywacji zapalnej komórek mikrogleju do umiarkowanego poziomu, a RANK osłabia sygnalizację TLR3 / TLR4⁴. Czy w tym kontekście Doktorantka uważa i czy ma jakieś dowody z innych badań, że wysokie poziomy OPG u jej pacjentów, są wyrazem zapalenia u chorych w chorobą Parkinsona, czy świadczą o dodatkowej chorobie naczyń mózgu, czy raczej związane są z czymś innym np. osteoporozą? W tym kontekście szkoda, że pacjenci nie mieli ocenianej miażdżycy t.t. sztywnych i gęstości kości, aby móc odpowiedzieć na to pytanie. Doktorantka nie odnosi się również do problemu czy zwiększony poziom OPG w grupie z dłuższym przebiegiem choroby wynika ze starszego wieku pacjentów czy raczej z zaawansowania choroby? Czy w analizie regresji liniowej zmienną był lub powinien być wiek chorych? Dodatkowo wiadomo, że poziom OPG może być różny w zależności od

⁴ Kichev A1, Eede P, Gressens P, Thornton C, Hagberg H. Implicating Receptor Activator of NF-κB (RANK)/RANK Ligand Signalling in Microglial Responses to Toll-Like Receptor Stimuli. *Dev Neurosci.* 2017;39(1-4):192-206.

ptci. Czy ten aspekt był brany pod uwagę, zważywszy dodatkowo na gorszy metabolizm kości u kobiet i nasiloną osteoporozę.

W dyskusji Doktorantka przechodzi do problemu gospodarki wapniowej i w sposób szeroki i wyczerpujący omawia przyczyny niskiego poziomu witaminy D3 w chorobie Parkinsona oraz potencjalnego jej wpływu np. na ryzyko upadków. W grupach badanych pacjentów bez choroby Parkinsona stwierdzono również niski poziom witaminy D3 co przeczy szczególnej podatności chorych z chorobą Parkinsona na zmniejszanie wchłaniania prekursorów witaminy czy gorsze jej wytwarzanie z różnych przyczyn (od związanych z mniejszą ekspozycją na światło słoneczne po cechy indywidualne). Doktorantka niestety nie omawia związku witaminy D3 i OPG np. w grupie kontrolnej; związek ten nie był obserwowany u chorych z udarem; u chorych z chorobą Parkinsona był na granicy istotności, ($P < 0,07$ poza przyjętą granicą błędu), co jednak wymaga komentarza.

W dalszej części dyskusji Doktorantka odnosi się do poszczególnych oznaczanych wskaźników (PTH, Ca, cholesterol) omawiając swoje wyniki w kontekście podobnych badań w chorobie Parkinsona. Brak jednak podsumowania czy wszystkie te wskaźniki mają lub nie wpływ na obserwowane poziomy OPG, czy gdzieś takie związki obserwowano, czy są potencjalnie możliwe.

Doktorantka omawia również wyczerpująco problemy chorych z chorobą Parkinsona związane z osteoporozą, złamaniami, upadkami – temat ważny i ciekawie omówiony, jednak nie jest wskazane jak odnosi się do omawianych wyników pracy. Tak samo parkinsonizm naczyniowy – omówiony wyczerpująco – nie ma wyraźnego powiązania z prowadzona dyskusją nad wynikami prezentowanymi w pracy.

Wnioski są sformułowane jasno i poprawnie i podsumowują całą pracę Doktorantki, pokazując że założone cele pracy zostały osiągnięte.

Podsumowując, całość pracy Doktorantki oceniam dobrze. Zarówno temat pracy jak i wykonanie i prezentacja wyników jest interesująca i przedstawiona w sposób wyczerpujący. Mimo pytań, które nasuwają się po czytaniu dyskusji i uwag dotyczących wstępu i metodyki pracy przedstawiona praca spełnia wszystkie wymagania stawiane pracy doktorskiej.

Konkluzja recenzji

Stwierdzam, że rozprawa doktorska lekarz Marty Piaścik-Gromady pt: „Ocena stężenia osteoprotegeryny w surowicy krwi pacjentów z chorobą Parkinsona.”, jest samodzielnym dorobkiem naukowym doktoranta i spełnia wymagania określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym (Dz.U.nr 65, poz.595 z późn.zm.) stawiane pracom na stopień doktora nauk medycznych. Jest bowiem oryginalnym rozwiązaniem problemu naukowego

oraz wykazuje ogólną wiedzę doktorantki w uprawianej dyscyplinie naukowej (medycyna) oraz umiejętności samodzielnego prowadzenia badań naukowych. Wnoszę do Rady Naukowej Centrum Medycznego Kształcenia Podyplomowego w Warszawie o dopuszczenie lekarz Marty Piaścik-Gromady do publicznej obrony.

Iwona Kurkowska-Jastrzębska



Warszawa 14 sierpnia 2019r.