



Katedra i Zakład Anatomii Prawidłowej Człowieka

Uniwersytetu Medycznego w Lublinie
ul. Jaczewskiego 4, 20-090 Lublin
tel. +48 81 7423678, fax. +48 81 7423674

Ocena rozprawy doktorskiej lek. med. Krzysztofa A. Tomaszewskiego pt.

„Wapnienie płytki granicznej, okluzji naczyń odżywczych oraz rola białek odpowiedzialnych za przetwarzanie nieorganicznego pirofosforu w chorobie degeneracyjnej szczywnych dysków międzykręgowych”,

wykonanej w Katedrze Anatomii i Katedrze Patomorfologii Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego, pod kierunkiem prof. dr hab. n. med. Jerzego A. Walochy

Choroby krążka międzykręgowego są poważanym problemem nie tylko zdrowotnym, ale i społecznym, gdyż stanowią jedną z głównych przyczyn dolegliwości bólowych oraz niezdolności do pracy. Zmiany najczęściej mają postać zwyrodnieniową i obejmują jądro miażdżyste oraz otaczający je pierścień włóknisty. Mechanizm uszkodzenia jest złożony jednak najnowsze publikacje wskazują, że dominuje w nim zanik komórek obu struktur w następstwie miejscowego obniżenia stężenia tlenu. U podłoża tego procesu leży zaburzenie krążenia krwi w obrębie blaszek granicznych sąsiadujących kręgów, które na drodze dyfuzji uczestniczą w wymianie gazowej i przekazywaniu substancji odżywczych, gdyż sam krążek nie jest unaczyniony. W następstwie niedotlenienia dochodzi do wzrostu pH, a następnie do obniżenia lub zahamowania podziałów komórkowych głównie fibroblastów i chondrocytów. Przedłużający się proces doprowadza do martwicy, włóknienia i zwapnień. Towarzyszy temu gromadzenie toksycznych metabolitów, które przyspieszają zmiany wsteczne. Niekorzystnie na metabolizm w obrębie krążka międzykręgowego wpływa także nadmierne obciążenie, które przyspiesza syntezę proteoglikanów, zaburzając ich fizjologiczną proporcję z kolagenem. Mechanizm ten potwierdzony został także w uszkodzeniu mechanicznym krążków. Opisane zmiany prowadzą do odwodnienia jądra miażdżystego – a w wyniku jednoczesnego osłabienia pierścienia włóknistego – do jego przemieszczenia, najczęściej dokanałowego z uniesieniem więzadła podłużnego tylnego kręgosłupa oraz opony twardej z uciskiem na korzenie sąsiadujących nerwów rdzeniowych i/lub rdzeń kręgowy.

W zależności od morfologii, wyróżnia się dokanałowe uwypuklenie krążka z zachowaną ciągłością, bądź z częściowym lub całkowitym przerwaniem pierścienia włóknistego i przepukliną jądra miażdżystego. Rzadziej dochodzi do przemieszczenia pod więzadło podłużne przednie kręgosłupa i dotrzonowo, w obręb sąsiadujących trzonów kręgów. Ostatni typ przepukliny jest charakterystyczny dla choroby Scheuermanna, która powstaje w wyniku aseptycznej martwicy blaszek granicznych trzonów kręgów i charakteryzuje się obecnością guzków Schmorla. Obecnie wśród czynników predysponujących do zmian zwyrodnieniowych krążka międzykręgowego wymienia się także zaburzenia genetyczne, zwłaszcza mutacje w genie *COL9A2*, który koduje jeden z polipeptydów kolagenu IX. Czynniki genetyczne i nieprawidłowa struktura tkanki łącznej leżą także u podstawy choroby Marfana, która charakteryzuje się mutacją w genie fibryliny 1. Mimo, że u pacjentów dominują objawy ze strony gałki ocznej i układu sercowo-naczyniowego, to u części dochodzi także do zniekształcenia kręgosłupa i uwypuklenia krążka.

W przeciwieństwie do bardzo dobrze znanej i rutynowo stosowanej diagnostyki obrazowej choroby krążka międzykręgowego, mechanizmy prowadzące do jego uszkodzenia są nadal niejasne i stanowią podstawowy cel szeregu prac doświadczalnych i klinicznych. W nurt tych ważnych badań wpisuje się przekazana do recenzji rozprawa doktorska lek. med. Krzysztofa A. Tomaszewskiego z Katedry Anatomii Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego.

Doktorant podjął się oceny wpływu zmian zwyrodnieniowych na morfologię i biomechanikę krążków międzykręgowych oraz przylegających płytek granicznych trzonów kręgów. Dokonał także próby zobrazowania liczby komórek w obu strukturach w celu opracowania map gęstości komórkowej, zawartości glikozaminoglikanów oraz immunoekspresji białek uczestniczących w metabolizmie pirofosforu t.j. białek błonowych ANK, fosfatazy alkalicznej (ALP), transformującego czynnika wzrostu beta 1 (TGF- β 1), osteopontyny (OPN) i ektonukleotydowej fosfodiesterazy 1 (ENPP1). Oceniał także zależność pomiędzy zwyrodnieniem krążków międzykręgowych a wapnieniem płytki granicznej oraz drożnością otworów odżywczych.

Przekazana do recenzji rozprawa liczy 158 stron maszynopisu, obejmującego manuskrypty czterech artykułów, z czego jeden została opublikowany a trzy przyjęto do druku:

1. Tomaszewski KA, Saganiak K, Gładysz T, Walocha JA. The biology behind the human intervertebral disc and its endplates. *Folia Morphol* (w druku).

2. Tomaszewski KA, Walocha JA, Mizia E, Gładysz T, Głowacki R, Tomaszewska R. Age- and degeneration-related variations in cell density and glycosaminoglycan content in human cervical intervertebral disc and its endplates. *Pol J Pathol* (w druku).
3. Tomaszewski KA, Adamek D, Pasternak A, Głowacki R, Tomaszewska R, Walocha JA. Degeneration and calcification of cervical endplate is connected with a decreased expression of ANK, ENPP-1, OPN and TGF- β 1 in the intervertebral disc. *Pol J Pathol* 2014, 65, 204-211.
4. Tomaszewski KA, Admek D, Konopka T, Tomaszewska R, Walocha JA. Endplate calcification and cervical intervertebral disc degeneration – the role of endplate marrow contact channel occlusion. *Folia Morphol* (w druku).

We wstępie dysertacji zamieszczono także notę informacyjną oraz podsumowanie pracy w języku polskim i angielskim. Na końcu zaś znajdują się listy od redakcji potwierdzające przyjęcie poszczególnych artykułów do druku.

Autor bardzo starannie zaplanował i wykonał doświadczalną część pracy, która prowadzona była we współpracy z Katedrą Patomorfologii, Katedrą Medycyny Sądowej i Katedrą Fizyki Medycznej macierzystej uczelni. Badanie miało charakter typowego eksperymentu naukowego, przeprowadzonego na materiale pobranym z reprezentatywnej liczny ciał. Za zgodą Komisji Biotycznej UJ CM (KBET/319/B/2012) – z uwzględnieniem rygorystycznego protokołu włączenia do badań – przebadano 60 krążków międzykręgowych wraz z przylegającymi blaszkami granicznymi, pobranych z 30 nieutrwalonych ciał w 24 godziny od zgonu. Bloki tkankowe badano radiologicznie przy pomocy tomografii komputerowej (mikroTK), która pozwoliła na płaszczyznową i trójwymiarową ocenę morfologii analizowanych struktur, w tym drożności kanałów naczyniowych w obrębie blaszek granicznych. Po wypreparowaniu badanych struktur, zaawansowanie zmian zwyrodnieniowych oceniane było makroskopowo z użyciem skali Thompson'a i mikroskopowo, w wycinkach pobranych z reprezentatywnych ściśle zmapowanych części krążka. Morfologię obu struktur, w tym wapnienie płytek granicznych, oceniano także w preparatach histologicznych wybarwionych rutynowo hematoksyliną i eozyną, metodą trójbarwną Masson-Goldner oraz p.a.S + błękitem alcianu. Dla zaawansowania zmian w płytkach granicznych stosowano skalę Boos'a. Liczbę komórek oceniono z użyciem metody Abercrombie pod powiększeniem x400

w orientacji przednio-tylnej i górnio-dolnej, co pozwoliło na opracowanie założonych w celu pracy map gęstości komórkowej dla całego krążka. Z wykorzystaniem specyficznych przeciwciał w skrawkach parafinowych oceniono immunоекспresję ANK1, ENPP1, TGF- β 1, fosfatazy alkalicznej i osteopontyny, które analizowano półilościowo. W oparciu o pracochłonne metody biochemiczne oceniono także poziom glikozaminoglikanów. We wszystkich trzech pracach oryginalnych materiały i metody opisano skrótowo, co wynika z charakteru opracowania, ale w sposób przejrzysty, precyzyjny i możliwy do odtworzenia. Otrzymane wyniki dokumentowano fotograficznie, a dane analizowano statystycznie w oparciu o adekwatne, prawidłowo dobrane testy. Dane liczbowe przedstawiono w tabelach i na wykresach. Na szczególne podkreślenie zasługują ryciny obrazujące gęstość komórkową, gdyż moim zdaniem jest to najbardziej nowatorska część pracy. Ta część dysertacji ma również największe implikacje kliniczne, gdyż pozwala na modelowanie i opracowanie podstaw rekonstrukcji krążka w oparciu o kontrolowane wszczepy komórek macierzystych.

Pierwsza z wymienionych prac jest opracowaniem poglądowym, przygotowanym w oparciu o najnowsze doniesienia w piśmiennictwie światowym, która w bardzo przystępny sposób zaznajamia czytelnika z rozwojem, morfologią i biomechaniką krążka międzykręgowego oraz płytek granicznych przylegających kręgów. Wiele miejsca poświęcono także zaburzeniom, jakie towarzyszą uszkodzeniu obu struktur, a zwłaszcza zmianom zwyrodnieniowym. Trzy kolejne prace to opracowania oryginalne, przygotowane w oparciu o typowy układ dla prac doświadczalnych. Zgodnie z przyjętą zasadą, we wstępie Autor umiejętnie zaznajamia czytelnika z tematem opracowania, kończąc rozdział jasno sprecyzowanym celem pracy. Jak wspomniano powyżej opis materiałów i metod nie budzi zastrzeżeń. Artykuły oryginalne zawierają także dokładny i czytelny opis przeprowadzonych doświadczeń i uzyskanych wyników. Na podkreślenie zasługuje bardzo dobrej jakości dokumentacja histologiczna, zwłaszcza że uwapnione krążki międzykręgowie i płytki graniczne nie należą do struktur, które łatwo podają się rutynowej obróbce. Najprawdopodobniej z powodu ograniczeń wynikających z wymogów redakcji zamieszczono dokumentację zdjęciową wyłącznie z preparatów barwionych metodą Massona oraz obrazujące immunoreaktywność ANK. Brak jest zaś dokumentacji dla immunоекспresji pozostałych białek. Warto podkreślić, że wszystkie prace oryginalne kończą się szczegółową dyskusją, w której uzyskane dane umiejętnie zestawiane są z wynikami innych badaczy. Autor prezentuje także ograniczenia wynikające z zastosowanej metodyki, a także charakterystyki grupy badanej. Ta część poszczególnych artykułów pozwala

najlepiej ocenić dojrzałość naukową lek. med. Krzysztofa A. Tomaszewskiego, który we wszystkich pracach był pierwszym autorem, a zgodnie z przedstawionymi danymi wykazał się także największym wkładem w przeprowadzenie doświadczeń i przygotowanie manuskryptów. Poszczególne prace kończą jasno sprecyzowane wnioski, które w pełni odpowiadają przyjętym założeniom. W przekazanym do recenzji cyklu artykułów wykazano, że największa gęstość komórkowa występuje w obrębie jądra miazdzystego i stopniowo obniża się w kierunku od przodu i na zewnątrz a wzrasta w kierunku do tyłu i na zewnątrz. Gęstość komórkowa zmniejsza się także wraz ze wzrostem stopnia zwyrodnienia ale nie wykazano zależności od wieku. Obserwacji tych nie potwierdzono dla płytek granicznych. Ważnym spostrzeżeniem wydaje się również fakt, że w obu badanych strukturach gęstość komórkowa koreluje z zawartością glikozaminoglikanów, których stężenie maleje wraz ze spadkiem aktywności metabolicznej komórek krążka międzykręgowego. Potwierdzono także, że immunoreaktywność wybranych białek zmniejsza się wraz ze wzrostem stopnia zwyrodnienia krążka i blaszek granicznych. Jedynym wyjątkiem była immunoekspresja fosfatazy alkalicznej, która wzrastała wraz ze nasileniem wapnienia blaszki granicznej. Do kluczowych obserwacji zawartych w dysertacji należy także wykazanie pozytywnej zależności pomiędzy drożnością otworów w płycie granicznej o średnicy 300 μm , a zwyrodnieniem krążka i blaszki granicznej. Jak zauważył Autor, obserwacje te dowodzą, iż opisane otwory te nie mogą zostać uznane za otwory/kanały odżywcze. Wskazuje na to fakt, iż nie zawierają naczyń i najprawdopodobniej są następstwem ścieńczenia oraz pęknięć blaszki granicznej, wynikającymi z jej zwyrodnienia. Liczba otworów odżywczych wykazywała przy tym negatywną zależność ze stopniem zwyrodnienia ocenianym na poziomie makro- i mikroskopowym. Przedstawione wyniki są nowatorskie i wartościowe, tak pod względem poznawczym, jak praktycznym. Jestem głęboko przekonany, że uzyskane dane oraz dalsze prace badawcze Doktoranta i Promotora rozprawy pozwolą na pogłębienie dotychczasowej wiedzy na temat zmian zwyrodnieniowych krążka międzykręgowego, a w niedalekiej przyszłości pomogą w opracowaniu nowych strategii postępowania terapeutycznego u pacjentów z chorobą krążka międzykręgowego.

W redagowaniu rozprawy Autor posłużył się aktualną literaturą polsko- i obcojęzyczną. Warto w tym miejscu podkreślić cytowania licznych prac przygotowanych w ośrodku krakowskim, w tym w macierzystej Katedrze Doktoranta. Dziwi jednak brak artykułów autorstwa prof. Skawiny, który jest niekwestionowanym autorytetem w omawianej tematyce.

Przedstawiony cykl czterech artykułów nie zawiera poważnych błędów. Napisany jest poprawnie z dużą dbałością o język angielski i szatę graficzną. Z pozycji recenzenta chciałbym jednak zauważyć, że największym a zarazem jedynym błędem w pracy jest brak poszanowania rodzimego języka. Ze względu na użyty żargon medyczny pierwsze dwa rozdziały czyta się źle. Doktorant stale używa zwrotów i sformułowań bezpośrednio zapożyczonych z języka angielskiego. Dobitnym tego przykładem jest tytuł dysertacji, który powinien brzmieć „Wapnienie płytki granicznej, zamknięcia naczyń odżywczych oraz rola białek odpowiedzialnych za przetwarzanie nieorganicznego pirofosforu w chorobie zwyrodnieniowej szyjnych krążków międzykręgowych”. Ponadto, w pracy analizowano immunoekspresję lub immunoreaktywność wybranych białek a nie ekspresję, gdyż termin ten odnosi się wyłącznie do genów. W części polskojęzycznej nie uniknięto sformułowań żargonowych np. produkcja proteoglikanów, sympatyczne włókna, rozwój rosnącego kręgosłupa, artykuł ... bada, dowóz substancji odżywczych, itp. Należy jednak podkreślić, że błędów tych nie zawiera część anglojęzyczna, co najprawdopodobniej jest przysłowiowym znakiem czasu. Na szczególne wyróżnienie zasługuje fakt, że wszystkie artykuły zostały przyjęte lub opublikowane w czasopismach z Listy Filadelfijskiej o łącznej punktacji IF 2,712 oraz 60 punktów MNiSzW. Część obserwacji prezentowana była także na zjazdach międzynarodowych, a doniesienie na 15 Kongresie EFORT (Londyn, 4-6.06.2014) zostało uhonorowane nagrodą za najlepszą prezentację plakatową. Nieobojętnym w ocenie dorobku naukowego jest również fakt, iż Doktorant na realizację projektu badawczego pozyskał środki finansowe z Narodowego Centrum Nauki z programów Preludium i Etiuda oraz dotację celową dla młodych naukowców.

Reasumując, w oparciu o duży materiał doświadczalny, uzyskany przy zastosowaniu nowoczesnych i wiarygodnych metod, głęboką wiedzę Doktoranta i swobodę w poruszaniu się w temacie będącym przedmiotem badań, uważam, że omawiana dysertacja w pełni odpowiada warunkom stawianym rozprawom na stopień doktora nauk medycznych zawartych w ustawie z 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki Dz. U. z 2003 r. Nr 65, poz. 595, z późniejszymi zmianami. Pozwalam więc sobie postawić wniosek Wysokiej Radzie Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum o dopuszczenie lek. med. Krzysztofa A. Tomaszewskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie ze względu na zaangażowanie w pracę badawczą, w tym skuteczne pozyskiwanie środków finansowych oraz walory poznawcze i kliniczne uzyskanych wyników, wnoszę o wyróżnienie rozprawy doktorskiej. Uważam jednocześnie, że dysertacja spełnia wszystkie wymogi ujęte w regulaminie Nagrody Naukowej Ministra Zdrowia, do której moim zdaniem powinna być nominowana przez Radę Wydziału.

KATEDRA I ZAKŁAD
ANATOMII PRAWIDŁOWEJ CZŁOWIEKA
Uniwersytetu Medycznego w Lublinie
20-090 Lublin, ul. dr K. Jaczewskiego 4
tel./fax.: (081) 742-36-78
-3-

Prof. dr hab. n. med.
Franciszek Burdan
specjalista radiologii
i diagnostyki obrazowej
4398418

Lublin, dnia 5 listopada 2014 r.

prof. zw. dr hab. n. med. Franciszek Burdan