



Przewodnicząca  
Rady Dyscypliny Nauki Medycznej  
\*dr hab. Katarzyna Sierakowska, prof. UMK  
WARSZAWSKI  
UNIwersYTET  
MEDYCZNY

KLINIKA CHOROÓB ZAKAŻNYCH  
WIEKU DZIECIĘCEGO

Warszawa, 27.06.2023

## RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

**Lek. Justyny Moppert**

Z Katedry Chorób Zakaźnych i Hepatologii Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu

Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy

w postępowaniu o nadanie stopnia naukowego doktora nauk medycznych

*pt. Powikłania hepatologiczne zakażenia EBV u dzieci z uwzględnieniem czynników predykcyjnych*

Zakażenie wirusem Epsteina-Barr (EBV) jest powszechne, dotyczy ponad 95% populacji. W przypadku dzieci jego przebieg jest zwykle bezobjawowy, rzadziej obserwowane są następstwa kliniczne pod postacią mononukleozy zakaźnej. Jedną z manifestacji zakażenia może być zapalenie wątroby. Łagodne podwyższenie aktywności aminotransferaz w przypadku zakażenia EBV jest powszechne, typowe i zwykle ma charakter samoograniczający się. W rzadkich przypadkach dochodzi do ciężkich powikłań hepatologicznych. Ze względu na powszechne występowanie zakażenia EBV w populacji istotne jest określenie, którzy pacjenci mogą być narażeni na wystąpienie ciężkich manifestacji choroby. Udowodniono, że może to dotyczyć pacjentów z immunosupresją. Czynniki predysponujące do wystąpienia zapalenia wątroby i cholestazy u dzieci immunokompetentnych nie są ustalone.

W swojej rozprawie doktorskiej lek. Justyna Moppert podjęła się nowatorskiego zadania, którego celem była identyfikacja potencjalnych markerów biochemicznych i genetycznych powikłań hepatologicznych zakażenia EBV, które mogłyby mieć zastosowanie w diagnostyce i monitorowaniu przebiegu mononukleozy zakaźnej. W związku z tym temat pracy lek. Justyny Moppert oceniam jako aktualny i mający potencjalnie ważne implikacje kliniczne dla tej grupy pacjentów.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska została przygotowana w formie monografii. Tekst rozprawy liczy 80 stron, na które składają się: spis treści, wykaz stosowanych skrótów, wprowadzenie, cel naukowy, opis grupy pacjentów, metodyka badań, wyniki, dyskusja, wnioski, streszczenia w języku polskim i angielskim, piśmiennictwo, spis rycin i tabel. Tekst rozprawy został opatrzony załącznikami, w skład których wchodzi opinie komisji bioetycznej oraz kopia zgody Rady Dyscypliny na zmianę tematu prac doktorskiej. Rozprawa została przygotowana w sposób staranny, co umożliwiło przejrzyste przedstawienie badanego zagadnienia oraz danych zebranych przez Doktorantkę.

**Tytuł pracy** właściwie odzwierciedla treść rozprawy. We **wprowadzeniu** Doktorantka w dokładny sposób przedstawia najważniejsze z punktu widzenia jej rozprawy doktorskiej zagadnienia związane z konsekwencjami zakażenia EBV, analizowanymi cytokinami, cząstkami adhezyjnymi, miRNA oraz transporterem błonowym BSEP. Ten fragment rozprawy świadczy o dobrej znajomości podjętego tematu przez Doktorantkę, która trafnie identyfikuje luki w aktualnym stanie wiedzy i problemy w postępowaniu diagnostycznym u dzieci z hepatologicznymi konsekwencjami zakażenia EBV, uzasadniając podjęcie tematu badawczego.

**Cele naukowe pracy** zostały sformułowane jednoznacznie. Za główny cel badawczy Doktorantka przyjęła analizę powikłań hepatologicznych u dzieci zakażonych EBV oraz identyfikację potencjalnych czynników predykcyjnych uszkodzenia wątroby u tych pacjentów. Szczególną uwagę Doktorantka poświęciła analizie wysokości wirerii EBV, stężeń wybranych cytokin (TNF- $\alpha$ , Il-6, s-ICAM-1), ekspresji miRNA (miR-122-5p, miR-21-3p, miR-34a-5p, miR-26b-5p, miR-199a-5p) oraz wyselekcjonowanych polimorfizmów genu ABCB11 (rs11568364, rs2287622).

Założone cele naukowe zostały zrealizowane w ramach weryfikacji następujących **4 hipotez badawczych**:

1. Wysokość wirerii EBV DNA wpływa na ryzyko wystąpienia powikłań hepatologicznych.
2. Ocena stężenia cytokin może być przydatna jako potencjalny marker prognostyczny powikłań hepatologicznych w przebiegu zakażenia EBV.
3. Analiza ekspresji miRNA jako nieinwazyjnych markerów molekularnych może być użyteczna w monitorowaniu powikłań hepatologicznych zakażenia EBV.
4. Polimorfizmy pojedynczych nukleotydów (SNP) mają wpływ na wystąpienie powikłań hepatologicznych w przebiegu zakażenia EBV.

Badanie zostało przeprowadzone za zgodą Komisji Bioetycznej przy Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu (Uchwała KB nr 673/2018). Badaniem objętych zostało **68 dzieci** (36 dziewcząt i 32 chłopców) w wieku od 1. do 18. roku życia, hospitalizowanych od 1.12.2018 do 21.12.2020 r. w Oddziale Pediatrii, Chorób



Infekcyjnych i Hepatologii Wojewódzkiego Szpitala Obserwacyjno-Zakaźnego z powodu zakażenia EBV (potwierdzonego serologicznie i molekularnie). Pacjenci zostali podzieleni na następujące grupy: IA – 33 pacjentów z podwyższoną aktywnością ALT i GGTP; IB – 21 pacjentów z podwyższoną aktywnością ALT i prawidłowym stężeniem GGTP; II (kontrolna) – 14 pacjentów zakażonych EBV z prawidłową aktywnością ALT i GGTP; III (porównawcza) – 13 dzieci zdrowych, z wykluczonym zakażeniem EBV.

**Metodyka** przeprowadzonych badań i oznaczeń została wyczerpująco opisana, z uwzględnieniem diagnostyki zakażenia EBV (choć nie wskazano, które konkretnie przeciwciała anti-EBV były oznaczane i w jakim czasie od początku objawów), badań biochemicznych, morfologicznych krwi, analizy stężeń Il-6, TNF- $\alpha$ , s-ICAM-1, izolacji i analizy ekspresji miRNA oraz genotypowania. Cenne jest uwzględnienie norm wyników badań biochemicznych i morfologicznych z podziałem na grupy wiekowe.

**Wyniki** badań zostały przejrzyście przedstawione w Tabelach 8 – 13 i na Rycinach 7 – 28 oraz podsumowane w tekście. Charakterystykę kliniczną badanej grupy pokazano z uwzględnieniem podziału na grupy IA, IB i II. Zgodnie z przyjętymi założeniami badania przedstawiono wyniki analiz dotyczących korelacji pomiędzy wiramią EBV a wybranymi parametrami laboratoryjnymi i czasem hospitalizacji, przeanalizowano poziomy cytokin i innych parametrów laboratoryjnych w grupie dzieci zakażonych vs. niezakażonych EBV, wraz z uwzględnieniem zależności pomiędzy nimi. Dokonano analizy ekspresji wybranych miRNA w grupie dzieci zakażonych i niezakażonych wraz z zależnościami ekspresji miRNA z aktywnością ALT i GGTP, przedstawiono rozkład genotypów i alleli dla polimorfizmu 1331T>C genu ABCB11 oraz oceniono wpływ wieku na przebieg zakażenia EBV.

W grupie badanej powikłania hepatologiczne dotyczyły 54/68 (80%) pacjentów, przy czym u 33/54 stwierdzono uszkodzenie bieguna żółciowego objawiające się zwiększeniem aktywności GGTP. Przeprowadzone przez Doktorantkę badania wykazały istotnie wyższe stężenie Il-6, TNF- $\alpha$ , s-ICAM-1 u dzieci z zapaleniem wątroby i uszkodzeniem bieguna żółciowego w porównaniu do pacjentów bez powikłań hepatologicznych. Ponadto potwierdzono dodatnią korelację pomiędzy aktywnością GGTP oraz aktywnością ALT i stężeniem TNF- $\alpha$  w grupie pacjentów z powikłaniami wątrobowymi. Wykazano związek pomiędzy ekspresją miR-122-5p, miR-21-3p, miR-34a-5p, miR-26b-5p, miR-199a-5p) a powikłaniami hepatologicznymi przebiegającymi z cholestazą. Stwierdzono ponadto przewagę homozygotycznego genotypu 1331TT w grupie pacjentów z zapaleniem wątroby i uszkodzeniem cholangiocyty. Doktorantka ustaliła, że obecność allelu T dla markera rs2287622 zwiększa 3-krotnie prawdopodobieństwo wystąpienia zapalenia wątroby i blisko 4-krotnie ryzyko cholestazy w przebiegu zapalenia wątroby. Nie ustalono związku pomiędzy wysokością wirerii EBV a ryzykiem powikłań hepatologicznych, natomiast potwierdzono jej związek z wzrostem CRP, TNF- $\alpha$ , liczbą leukocytów, limfocytów i monocytów.

Przeprowadzona przez Doktorantkę **dyskusja** odnosi się bezpośrednio do uzyskanych wyników badań, świadczy o zdolności interpretacji i analizy piśmiennictwa oraz umiejętności porównania wyników własnych z danymi literaturowymi.

W podsumowaniu rozprawy Doktorantka przedstawiła **wnioski** płynące z przeprowadzonych badań. Zostały one zestawione w sposób przejrzysty i usystematyzowane w punktach, odnoszących się do sformułowanych wcześniej celów rozprawy doktorskiej.

Za najistotniejsze osiągnięcia Doktorantki należy uznać następujące wnioski płynące z przeprowadzonych badań:

1. Brak związku pomiędzy wysokością wirerii EBV a ryzykiem rozwoju powikłań hepatologicznych.
2. Wzrost stężenia Il-6, TNF- $\alpha$ , s-ICAM-1 w przebiegu zakażenia EBV wskazuje na ryzyko wystąpienia zapalenia wątroby z cholestazą.
3. Zwiększona ekspresja wybranych miRNA u dzieci zakażonych EBV stanowi czynnik ryzyka wystąpienia powikłań hepatologicznych.
4. Polimorfizm rs2287622 genu ABCB11 ma wpływ na wystąpienie powikłań hepatologicznych w przebiegu zakażenia EBV u dzieci, w szczególności obecność allelu T dla markera rs2287622 zwiększa 3-krotnie prawdopodobieństwo wystąpienia zapalenia wątroby i blisko 4-krotnie ryzyko cholestazy w przebiegu zapalenia wątroby.

**Piśmiennictwo**, w liczbie **134 pozycji**, jest aktualne, starannie dobrane i odnosi się bezpośrednio do adresowanej w rozprawie problematyki. **Streszczenia** w języku polskim i angielskim prawidłowo podsumowują najważniejsze wyniki badań i wnioski całej rozprawy.

Z obowiązku recenzenta pozwolę sobie wskazać kilka **uwag i komentarzy**, które nasunęły mi się podczas lektury rozprawy:

1. Praca napisana jest starannie, poprawnym językiem. Pojedyncze błędy stylistyczne (np. na str. 8, 11, 13, 27, 32) nie wpływają na odbiór i czytelność rozprawy. Sugerowałabym jednak, aby w przyszłości, w szczególności przy przygotowaniu publikacji, zwrócić większą uwagę na niewłaściwe użycie myślników w miejsce łączników (np. Il - 6, TNF -  $\alpha$ , s - ICAM - 1 zamiast Il-6, TNF- $\alpha$ , s-ICAM-1).
2. Na str. 14 Doktorantka słusznie zauważa, że przeciwciała heterofilne w przebiegu zakażenia EBV u najmłodszych dzieci są wykrywane u niewielkiego odsetka pacjentów, podczas gdy na str. 15 i 53 jest mowa o dużym odsetku fałszywie dodatnich wyników badań



serologicznych w grupie najmłodszych pacjentów – wymaga wyjaśnienia, o które przeciwciała chodzi.

3. W Metodologii pracy brakuje dookreślenia jasnych kryteriów włączenia i wyłączenia pacjentów do/z badania. W szczególności, warto byłoby podać, czy do badania włączano wyłącznie dzieci immunokompetentne; czy były włączane dzieci z chorobami przewlekłymi, w szczególności dotyczącymi wątroby; czy włączano pacjentów otyłych, co może mieć związek z chorobą tłuszczową wątroby, wpływając na wyniki badań? W charakterystyce podstawowej warto byłoby uwzględnić wartości BMI z-score dla badanych grup. Ponadto, czy wykluczano u tych pacjentów inne przyczyny zapalenia wątroby – w szczególności CMV, ze względu na często obserwowaną koinfekcję EBV/CMV?
4. W opisie analizy statystycznej Doktorantka podała jako poziom istotności statystycznej wartość  $p < 0,05$ , co jest standardowo uznawaną wartością odcięcia. Wobec tego nie można uznać za istotne statystycznie wartości  $p = 0,05$ , a tym samym nie są uprawnione następujące stwierdzenia pojawiające się w Wynikach pracy:
  - a. w grupie IA stwierdzono istotnie statystycznie wyższy odsetek dziewcząt niż w grupie II (str. 34);
  - b. potwierdzono związek pomiędzy wysokością wirerii EBV a czasem hospitalizacji (str. 34);
  - c. wykazano dodatnią korelację pomiędzy aktywnością ALT i IL-6 (str. 40-41).Uzasadnione byłoby uznanie, że powyższe korelacje są na granicy istotności statystycznej.
5. W Tabelach 9. i 11., zgodnie z przyjętą wcześniej nomenklaturą podziału pacjentów na grupy, należałoby konsekwentnie w nagłówku tabeli zamiast „Zakażeni EBV” napisać „Grupa I i II”.
6. W punkcie 6. Wyników analizowano wpływ wieku na czas hospitalizacji. Wydaje się, że zasadna byłaby tu analiza wieloczynnikowa lub odniesienie się w Dyskusji do kwestii czynników wpływających na długość hospitalizacji pacjentów z mononukleozą zakaźną. Moment wypisu dziecka do domu stanowi dość subiektywną decyzję lekarza, być może łatwiej podejmuje się tę decyzję w przypadku pacjentów starszych, bardziej zdyscyplinowanych np. w kwestii zaleceń dotyczących spoczynkowego trybu życia i unikania urazów brzucha.
7. W punkcie 6. Wyników potwierdzono wyższą leukocytozę u dzieci najmłodszych – ta obserwacja może wynikać m.in. z przedstawionych norm laboratoryjnych (najmłodsze dzieci mają wyższe prawidłowe wartości liczby leukocytów, jak przedstawiono w Tabeli 7).

8. Czy analizując wartości CRP wyłączono z badania pacjentów, u których potwierdzono nadkażenie bakteryjne gardła? Jak wiadomo, istotny odsetek pacjentów z mononukleozą rozwija to powikłanie, co mogłoby wpływać na wartości CRP i zafałszować wyniki analiz.
9. Wobec uzyskanych istotności statystycznych wyników, wnioski 2 i 3 mogłyby być bardziej stanowcze (z wykluczeniem określeń „wydaje się”, „może wskazywać”).

**Pragnę podkreślić, że przedstawione powyżej uwagi nie umniejszają wysokiej wartości merytorycznej ocenianej rozprawy doktorskiej. Traktuję je raczej jako sugestie dla Doktorantki przy przygotowaniu publikacji oraz planowaniu dalszych badań niż jako krytykę przedstawionej pracy.**

**Podsumowując**, przedstawiona do recenzji rozprawa stanowi oryginalne dokonanie Doktorantki i świadczy o jej dojrzałości naukowej i klinicznej oraz o bardzo dobrym opanowaniu warsztatu pracy naukowej, wymaganym od kandydata na stopień doktora nauk medycznych. Chciałabym podkreślić, że wyniki uzyskanych badań, poza oryginalnym aspektem naukowym, mają istotne implikacje dla codziennej praktyki klinicznej. Co prawda, nie jest możliwe przeprowadzenie wszystkich wykonanych tu oznaczeń u każdego pacjenta, niemniej przedstawione wyniki badań Doktorantki odpowiadają na istotne pytania dotyczące przyczyn zróżnicowanego przebiegu klinicznego mononukleozy zakaźnej i jej powikłań hepatologicznych u dzieci.

**Rozprawa doktorska 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 zaszczyt i przyjemność zwrócić się do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauki Medyczne Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu Collegium Medicum w Bydgoszczy z prośbą o dopuszczenie lek. Justyny Moppert do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

Podpis jest prawidłowy

Dokument podpisany przez Maria Pokorska-  
Śpiewak  
Data: 2023.06.27 11:14:18 CEST

*Prof. dr hab. n. med. i n. o zdr. Maria Pokorska-Śpiewak  
Klinika Chorób Zakaźnych Wieku Dziecięcego  
Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego*