



UNIwersytet Medyczny w Lublinie

Klinika Chorób Płuc i Reumatologii Dziecięcej, II Katedra Pediatrii

Kierownik Kliniki: Prof. dr hab. n. med. Andrzej Emeryk

20-093 Lublin, ul. Prof. A. Gębali 6
tel. 81 71 85 477, tel/fax 81 74 30 141

Lublin, dnia.16.04.2018 r.

Dr hab. n. med. Violetta Opoka-Winiarska
Klinika Chorób Płuc i Reumatologii Dziecięcej
Uniwersytet Medyczny w Lublinie
ul. Prof. A. Gębali 6, 20-093 Lublin
e-mail: violetta.opoka-winiarska@umlub.pl

RECENZJA ROZPRAWY NA STOPIEŃ DOKTORA NAUK MEDYCZNYCH

lek. med. Krzysztofa Orczyka

**pt: Ocena przydatności nowych biomarkerów serologicznych w leczeniu
i monitorowaniu aktywności choroby u dzieci z młodzieńczym idiopatycznym
zapaleniem stawów**

Termin „biomarker” został zdefiniowany w 1998 r. przez grupę roboczą National Institutes of Health Biomarkers Definitions jako "cecha obiektywnie mierzona i oceniana jako wskaźnik prawidłowych procesów biologicznych, procesów patogennych lub odpowiedzi farmakologicznych na interwencję terapeutyczną". W przypadku choroby zapalnej o podłożu autoimmunologicznym, jaką jest młodzieńcze idiopatyczne zapalenie stawów (MIZS), warunkiem poprawy skuteczności postępowania terapeutycznego jest identyfikacja biomarkerów zarówno dla rozpoznania, monitorowania aktywności choroby jak i przewidywania progresji oraz odpowiedzi na leczenia. Dotychczas wykorzystywane markery cechują się niewystarczającą czułością i specyficnością.

Przedstawiona do recenzji praca na stopień doktora nauk medycznych lek. med. Krzysztofa Orczyka podejmuje w sposób nowatorski temat ustalenia biomarkerów,

które mogłyby determinować postępowanie terapeutyczne na różnych etapach aktywności MIZS.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska składa się ze 100 stron wydruku komputerowego w typowym układzie: wykaz skrótów, wstęp, uzasadnienie podjęcia badań, cele pracy, materiał i metody, wyniki, dyskusja, wnioski, streszczenie w języku polskim i angielskim, piśmiennictwo oraz spis tabel i rycin. Piśmiennictwo obejmuje 104 pozycje. Praca zawiera 27 rycin i 9 tabel. Rozprawa jest prawidłowo zredagowana.

Wstęp pracy w sposób jasny szeroko omawia jednostkę chorobową będącą przedmiotem badań, kolejno: kryteria rozpoznania, epidemiologię, patogenezę, czynniki środowiskowe, predyspozycję genetyczną, klasyfikację, objawy kliniczne, ocenę aktywności choroby, leczenie. Wstęp zajmuje w 30 stron, z których 20 pierwszych przedstawia powyższe aspekty choroby. Tematem pozostałych 10 stron są dotychczas stosowane i nowe biomarkery choroby. W mojej opinii część ogólna wstępu mogłaby zostać skrócona. Część dotycząca biomarkerów interesująco i wyczerpująco przedstawia aktualną wiedzę na temat znaczenia klasycznych i nowych biomarkerów w MIZS, co jest istotne dla zrozumienia przedmiotu badań.

Celowość zaplanowanych badań przedstawiono w rozdziałach „uzasadnienie podjęcia badań” oraz „cele pracy”. W uzasadnieniu podjęcia badań Autor podkreśla znaczenie biomarkerów jako czynników prognozujących odpowiedź na leczenie. Wskazane cele pracy rozszerzają problem o znaczenie diagnostyczne. Jako badane biomarkery wybrano białka S100A8/A9 (kalprotektyna), białko S100A12 (kalgranulina C) oraz VE-kadheryna. Wprawdzie uzasadnienie do ich badania można odczytać we wstępie, tym niemniej proponowałabym uzupełnienie rozdziału o celowość wyboru tych właśnie biomarkerów lub hipotezę badawczą. Cele badania przedstawiono zwięźle i logicznie, w postaci pytań.

1. Czy stężenie białek S100A8/A9, S100A12 oraz VE-kadheryny w surowicy u dzieci z MIZS różni się w porównaniu do zdrowych rówieśników?
2. Jak jest stężenie białek S100A8/A9, S100A12 oraz VE-kadheryny w surowicy u dzieci z MIZS na różnych etapach zaawansowania choroby?
3. Czy istnieje zależność między stężeniami badanych biomarkerów a postacią choroby oraz stopniem jej aktywności?
4. Czy wymienione białka mogą być wykorzystywane w diagnostyce, rokowaniu oraz prognozowaniu odpowiedzi na leczenie?
5. Czy istnieje zależność między nowymi biomarkerami a „klasycznymi” markerami serologicznymi?

6. Czy zasadne byłoby oznaczanie stężenia S100A8/A9 w surowicy u wszystkich pacjentów będących pod opieką reumatologa dziecięcego z powodu MIZS?

W rozdziale dotyczącym materiału i metod opisano grupę badaną, którą stanowiło 80 pacjentów z rozpoznaniem MIZS. Badaniem zostali objęci pacjenci z rozpoznanymi różnymi postaciami MIZS, którzy byli hospitalizowani w Klinice w okresie styczeń 2017 – luty 2018, z wykluczeniem postaci o początku układowym. Wydają się, że pracę zaplanowano jako badanie prospektywne, chociaż nie określono tego wprost. Badanie pierwsze przeprowadzono w czasie hospitalizacji z powodu postawionego rozpoznania MIZS i włączenia leczenia (16 dzieci), z powodu zaostrzenia choroby (26 dzieci), a także w trakcie kontynuacji leczenia biologicznego (9) lub wizyty kontrolnej (29). U 53 chorych wykonano ponownie badanie w tzw. drugim punkcie czasowym, średnio po $102,4 \pm 26$ dniach. Grupę kontrolną stanowiło 29 dzieci z czynnościowymi zaburzeniami układu krążenia.

Na przeprowadzenie badania uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym w Łodzi (Uchwała nr RNN/31/17/KE z dnia 14 lutego 2017r.). Jest oczywistym, że zgodnie ze standardami rodzice i uczestnicy badania wyrazili pisemną zgodę na udział w projekcie, niemniej proponuję w publikacji uzupełnienie tej informacji.

Zastosowane metody statystyczne są odpowiednie do zebranego materiału. Proponuję uzupełnienie rozdziału o informację o zastosowaniu w ocenie wyników i ustaleniu punktów odcięcia wskaźnika Youdena.

Otrzymane wyniki Autor przedstawia szczegółowo, starannie wykorzystując dane. W rozdziale 6.6.1. przedstawiona została charakterystyka grupy badanej i kontrolnej. W kolejnych Tabelach przedstawiono płeć i wiek pacjentów oraz wyniki badań laboratoryjnych.

Podstawową skalą do oceny aktywności MIZS, jak opisane zostało w rozdziale 2.1.6. jest skala JADAS, w badaniu zastosowano wariant JADAS27. Ocena wg JADAS 27 opiera się na ocenie wyniku OB (lub CRP), ogólnej aktywności choroby dokonanej przez lekarza w skali VAS, ogólnej oceny samopoczucia pacjenta dokonanej przez chorego lub rodzica w skali VAS oraz liczby aktywnych zapalnie stawów ustalonych dla JADAS 27. Z wymienionych parametrów przedstawiono wartości OB. Proponuję rozszerzenia opisu grupy o dane dotyczące pozostałych parametrów JADAS oraz obliczonego parametru JADAS27. Ponieważ w planie badania jest odniesienie wyników do terapii, proponuję także uzupełnienie o informację dotyczącą leczenia stosowanego w czasie badania. W rozdziale umieszczono Rycinę 7 obrazującą rozkład aktywności choroby zależnie od JADAS 27. W opisie odwołano

się do Ryciny 1, jednak błędnie został podany nr rozdziału, w którym została ona umieszczona (prawidłowo 2.1.6.).

W kolejnych podrozdziałach 6.2 – 6.11. przedstawiona zostały wyniki badanych biomarkerów.

Wykazano istotnie statystycznie wyższe wyniki wszystkich badanych trzech biomarkerów u dzieci z MIZS w porównaniu do kontroli w pierwszym badaniu w stosunku do grupy kontrolnej, ale drugie badanie nie potwierdziło takiej różnicy.

Porównanie stężeń biomarkerów w zależności od płci nie wykazało, zgodnie z oczekiwaniami, istotnych różnic. W opisie znajduje się informacja na temat braku zależności pomiędzy stężeniem badanych biomarkerów a wiekiem pacjenta w chwili rozpoznania i wiekiem w chwili włączenia do badania. Ocenę ułatwiłoby uzupełnienie podrozdziału o tabelę z wynikami będącymi podstawą do tego wniosku.

Następny podrozdział przedstawia wyniki stężeń badanych biomarkerów w zależności od powodu hospitalizacji, które podzielono na świeże rozpoznanie, zaostrzenie choroby podstawowej, kontynuacja leczenia klinicznego, wizyta kontrolna. Wykazano, że stężenia badanych biomarkerów były istotnie wyższe w porównaniu z grupą kontrolną niezależnie od powodu hospitalizacji. Podobnie, proponuję uzupełnienie informacji o liczebność badanej grupy, oraz opisanie dla którego pobrania wykonano analizę. Ocenę ułatwiłoby podanie wyników w postaci wartości liczbowych.

Do najważniejszych obserwacji przedstawionego badania zaliczyłabym porównanie stężenia biomarkerów zależnie od postaci MIZS i aktywności choroby. Zaznaczono, że analizowano wyniki obu punktów czasowych. Wartości badanych parametrów nie różniły się statystycznie pomiędzy postacią skąpostawową, wielostawową RF(-) oraz z zapaleniem przyczepów ścięgnistych i grupą kontrolną. Ponieważ cenne byłoby sprawdzenie, jak zachowują się powyższe parametry w poszczególnych postaciach MIZS zależnie w czasie aktywności choroby, proponowałabym dla celów publikacji wykonanie porównania pomiędzy postaciami tylko w grupie pacjentów w z aktywną chorobą.

Porównanie badanych biomarkerów w zależności od stopnia aktywności choroby wg Autora wykazało najwyższe wartości białek S100A8/A9 oraz S100A12 u pacjentów z wysoką aktywnością choroby, co przedstawiono na rycinach. Dyskusyjna jest powyższa interpretacja wyników w aspekcie informacji o braku istotności statystycznej różnic pomiędzy ocenianymi grupami. Wykazano natomiast ujemną korelację stężenia VE-kadheryny ze stopniem aktywności choroby. Tutaj także oprócz wykresów proponowałabym

uzupełnienie o wyniki w postaci wartości liczbowych zarówno dla stężeń jak i JADAS27, a także liczebności badanych grup.

Ocena stężenia badanych biomarkerów w zależności od stosowanej terapii glikokortykosteroidami (GKS) wykazała istotnie wyższe stężenia białka S100A8/A9 oraz niższe wartości VE-kadheryny u chorych przyjmujących GKS (43 dzieci z MIZS) w porównaniu z chorymi bez leczenia GKS. W II punkcie czasowym wykazano istotnie niższe wartości VE-kadheryny zarówno u pacjentów przyjmujących GKS jak i tych, którzy jednocześnie z czasem pierwszej oceny otrzymali GKS dostawowo. Są to bardzo ważne obserwacje. Dla celów publikacji proponowałabym uzupełnienie tej części o opis badanych grup – zarówno pod względem liczebności, dawki GKS jak i czasu przyjmowania leku w obu punktach czasowych. Ocenę ułatwiłoby podanie wartości liczbowych otrzymanych wyników.

W wynikach opisano także dynamikę stężeń badanych biomarkerów w dwóch punktach czasowych. Wyniki podano jako odsetek pacjentów z II punktu czasowego, u których stężenie badanego biomarkera wzrosło lub zmniejszyło się i odsetka pacjentów ze wzrostem albo zmniejszeniem wartości JADAS27. Wydaje się, że interesująca mogła być analiza związku pomiędzy tymi parametrami z zastosowaniem metod analizy statystycznej.

Analiza zależności pomiędzy stężeniami badanych biomarkerów a wybranymi parametrami laboratoryjnymi wykazała dodatnią korelację stężeń białek S100/A9, S100A12 i wartościami OB, CRP i liczbą białych krwinek w 1 μ l (WBC). Nie wykazano takiej zależności dla VE-kadheryny. Zgodnie z opisem nie wykazano istotnych różnic stężeń badanych biomarkerów pomiędzy pacjentami zależnie od obecności RF, ANA i antygenu HLA-B27. Ocenę ułatwiłoby przedstawienie wartości liczbowych dla tych wyników.

Bardzo wartościową częścią pracy jest analiza czułości i swoistości diagnostycznej oraz wartości predykcyjne badanych biomarkerów w diagnostyce MIZS. W tym celu wykreślono krzywe ROC, obliczono wskaźniki Youdena i punkty odcięcia. Wykazano wysoką swoistość diagnostyczną dla białek S100A8/A9 oraz S100A12 oraz wysoką czułość dla VE-kadheryny dla zaproponowanych punktów odcięcia, przy wartościach wskaźnika Youdena 0,43 – 0,56.

Badane biomarkery oceniono jako czynniki predykcyjne przebiegu choroby. Przedstawiono wyniki dla białka S100A12 wykazując jego czułość diagnostyczną jako czynnika predykcyjnego zaostrzenia choroby. Proponowałabym uwzględnienia w ocenie wartości predykcyjnej także wskaźnika Youdena, którego wartość dla parametru „wysoka aktywności choroby” była niska i wynosiła 0,08.

Dyskusja uzyskanych wyników jest wnikliwa i dowodzi wiedzy Autora oraz umiejętność jej wykorzystania. Widoczna jest także umiejętność krytycznej oceny danych z piśmiennictwa.

Wskazano, że stężenia wszystkich biomarkerów ocenianych w niniejszej pracy były istotnie wyższe u pacjentów z MIZS niż u zdrowych rówieśników bez względu na etap zaawansowania choroby. Moje pytanie do Autora dotyczyłoby komentarza do faktu, iż w II punkcie badania nie wykazano różnic badanych parametrów pomiędzy grupą badaną i kontrolą.

W dyskusji omówiono brak istotnych zależności między badanymi biomarkerami lub stopniem aktywności choroby a stężeniem witaminy D. Jest to bardzo cenna informacja, jednak proponowałabym uzupełnienie wyników o rezultaty takiej oceny.

Bardzo ważne jest, iż Doktorant krytycznie odniósł się do wyników badań, wskazując na ich ograniczenia. Całość dyskusji świadczy o dobrym przygotowaniu i znajomości tematu przez Doktoranta.

Wnioski zostały przedstawione w pięciu punktach, które odpowiadają na zawarte w celu pracy pytania:

1. Uwzględnione w badaniu biomarkery mogą być wykorzystywane jako markery diagnostyczne MIZS: VE-kadheryna jako badanie przesiewowe (wysoka czułość), S100A8/A9 i S100A12 jako badania potwierdzające (niemal idealna swoistość).

2. Badanie stężenia S100A8/A9, jako najłatwiej dostępne, mogłoby być rutynowo wykonywane u dzieci z podejrzeniem MIZS celem przyspieszenia lub wykluczenia rozpoznania.

3. Stężenia badanych biomarkerów nie zależą od uwzględnionych postaci MIZS (skąpostawowej, wielostawowej RF-ujemnej, ERA) ani „klasycznych” markerów serologicznych.


4. Dynamika stężeń VE-kadheryny jest miarodajnym wskaźnikiem odpowiedzi na leczenie. Stosowanie GKS może jednak obniżyć wartość prognostyczną tego białka.

5. Białko S100A12 może być wykorzystywane jako czuły marker zaostrzenia MIZS lub utrzymywania się wysokiej aktywności choroby. Wartości tego biomarkera są niezależne od stosowania GKS.

Należy podkreślić nowatorski charakter wniosków i ich istotne znaczenie dla praktyki klinicznej.

Streszczenie jest napisane w sposób typowy dla rozpraw doktorskich. Piśmiennictwo zostało odpowiednio dobrane, obejmuje 104 pozycje, w większości anglojęzyczne, 70% cytowanych artykułów pochodzi z ostatnich 10 lat.

Podsumowując, przedstawioną do recenzji rozprawę doktorską lek. med. Krzysztofa Orczyka oceniam pozytywnie. Praca stanowi ważny wkład w badania nad nowymi biomarkerami w MIZS. Warte podkreślenia jest, że jeden z biomarkerów nie był dotąd badany u dzieci. Podjęty temat jest nowatorski, ma istotne wartości praktyczne, a wyniki mogą w przyszłości być wykorzystane w pracy klinicznej. Doktorant sprawnie korzystał ze źródeł, prawidłowo dobierając literaturę naukową. Cele prac zostały sformułowane poprawnie, metody i narzędzia badawcze prawidłowo dobrane i zastosowane. Analiza wyników oraz dyskusja zostały przeprowadzona prawidłowo oraz posumowane logicznymi wnioskami. Powyższe uwagi Recenzenta, w większości redakcyjne, nie umniejszają wartości Rozprawy. Przedstawiona do oceny praca lek. med. Krzysztofa Orczyka w mojej ocenie spełnia wymogi stawiane rozprawie na stopień naukowy doktora nauk medycznych określone w art.13. Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595 z późn. zm.). Wnoszę zatem do Wysokiej Rady Wydziału Nauk o Zdrowiu Uniwersytetu Medycznego w Łodzi o dopuszczenie lek. med. Krzysztofa Orczyka do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Wnoszę również o wyróżnienie pracy.



Dr hab. n. med. Violetta Opoka-Winiarska