

Kraków, dnia 14 kwietnia 2018 r.

RECENZENT

dr hab. med. Zbigniew Żuber, prof. nadzw.
Katedra Pediatrii Wydziału Lekarskiego
Krakowskiej Akademii A. Frycza-Modrzewskiego
Oddział Dzieci Starszych
z pododdziałami Neurologii i Reumatologii
Szpitala Dziecięcego św. Ludwika w Krakowie

**Recenzja rozprawy na stopień
doktora nauk medycznych
lek. Krzysztofa Orczyka
zatytułowanej**

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

Promotor: dr hab. n. med. prof. nadzw. Elżbieta Smolewska

Przedstawiona do recenzji praca lekarza Krzysztofa Orczyka jest monograficznym opracowaniem przedstawiającym analizę dotychczasowego stanu wiedzy na temat stosowania biomarkerów serologicznych w postępowaniu u pacjentów z MIZS, celem pracy doktoranta była próba uzyskania odpowiedzi na następujące pytania:

1. Czy stężenie białek S100A8/A9, S100A12 oraz VE-kadheryny w surowicy u dzieci z MIZS różni się w porównaniu do zdrowych rówieśników?
2. Jakie 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?

Doktorant przeprowadził projekt badawczy w Klinice Kardiologii i Reumatologii Dziecięcej w okresie styczeń 2017 – luty 2018 w oparciu o kohortę 80 pacjentów z rozpoznaniem MIZS. Badanie zostało przeprowadzone po pozytywnym zaopiniowaniu przez Komisję Bioetyczną przy Uniwersytecie Medycznym w Łodzi. Z badania wykluczono pacjentów z postacią o początku uogólnionym ze względu na jej odmienną patogenezę. U 53 dzieci próbki krwi pobrano w dwóch punktach czasowych celem oceny dynamiki stężeń badanych biomarkerów oraz ewaluacji ich wartości prognostycznej.

Na podstawie danych medycznych pacjentów stworzono bazę danych zawierającą informacje na temat danych demograficznych i medycznych, czasowych uwarunkowań przebiegu choroby, parametrów klinicznych zapalenia stawów i przebiegu choroby, aktualnie stosowanego leczenia oraz wyniki badań laboratoryjnych rutynowo wykonywanych u pacjentów z MIZS:

Wyniki uzyskane w grupie badanej porównano z dostosowaną pod kątem płci i wieku grupą kontrolną liczącą 29 pacjentów wyłonionych spośród pacjentów Kliniki Kardiologii i Reumatologii Dziecięcej hospitalizowanych z powodu czynnościowych zaburzeń układu krążenia. Po skompletowaniu grup pacjentów wykonano oznaczenia stężeń biomarkerów metodą immunoenzymatyczną ELISA.

Uzyskane wyniki:

a. Stężenia S100A8/A9, S100A12 oraz VE-kadheryny w surowicy uzyskane przy pierwszym pobraniu krwi w grupie badanej były istotnie wyższe niż w grupie kontrolnej.

b. Wyniki uzyskane w grupie badanej w drugim punkcie czasowym również były wyższe niż wartości w grupie kontrolnej, różnice nie były jednak istotne statystycznie.

c. Stężenia S100A8/A9, S100A12 oraz VE-kadheryny były niezależne od płci i wieku pacjenta. Zakres wartości biomarkerów u chłopców i dziewcząt w grupie badanej przedstawiają Ryciny 8-10. Nie wykazano istotnych statystycznie korelacji między wiekiem w chwili rozpoznania MIZS lub wiekiem w chwili włączenia do badania a stężeniami badanych biomarkerów.

d. Wartości S100A8/A9, S100A12 oraz VE-kadheryny były wyższe u pacjentów z MIZS niż w grupie kontrolnej bez względu na powód hospitalizacji. Kalprotektyna oraz kalgranulina C osiągały najwyższe wartości u pacjentów przyjętych z powodu zaostrzenia choroby podstawowej, różnice z wynikami uzyskanymi w pozostałych podgrupach nie były jednak istotne statystycznie. Stężenia VE-kadheryny były istotnie wyższe u pacjentów w trakcie leczenia biologicznego ($p < 0,001$).

e. Wyniki biomarkerów uzyskane w obu punktach czasowych porównano pod kątem rozpoznanej postaci choroby. Postać wielostawowa RF-dodatnia została pominięta w tej części analizy ze względu na niską liczebność próby ($n=1$). Wartości S100A8/A9, S100A12 oraz VE-kadheryny nie różniły się w sposób istotny statystycznie między poszczególnymi typami MIZS.

f. Stężenia kalprotektyny oraz kalgranuliny C osiągały najwyższe wartości u pacjentów z wysoką aktywnością choroby. Różnica nie była jednak istotna statystycznie (S100A8/A9: $p=0,22$, S100A12: $p=0,78$). Stężenie VE-kadheryny ujemnie korelowało ze stopniem aktywności choroby ($r=-0,375$, $p < 0,001$).

g. Oprócz leczenia modyfikującego przebieg choroby, u 43 dzieci z MIZS (53,8%) w chwili włączenia do badania stosowano również systemowe GKS. Dwudziestu czterech pacjentów (30,0%) podczas pierwszego pobytu w Klinice wymagało także dostawowej podaży GKS. Pacjenci przyjmujący systemowe GKS mieli istotnie wyższe stężenie S100A8/A9 ($p=0,0288$) oraz niższe wartości VE-kadheryny ($p=0,00296$). Różnicy takiej nie stwierdzono w przypadku S100A12 ($p=0,426$). W drugim punkcie czasowym wykazano niższe wartości VE-kadheryny zarówno u pacjentów, którzy w chwili włączenia do badania przyjmowali doustne GKS ($p=0,00485$, jak również u tych, którzy podczas pierwszej hospitalizacji wymagali dostawowej podaży GKS.

h. Stężenia S100A8/A9 oraz S100A12 dodatnio korelowały z wartościami CRP, OB oraz WBC. Zależności z powyższymi parametrami nie obserwowano w przypadku VE-kadheryny.

i. Nie wykazano istotnych różnic w stężeniach badanych biomarkerów między pacjentami, u których stwierdzono obecność RF, przeciwciał ANA, antygenu HLA-B27.

Na podstawie przeprowadzonych badań doktorant dokonał analizy zgromadzonych danych i przedstawił następujące wyniki:

A. czułości i swoistości badanych biomarkerów jako markerów diagnostycznych MIZS i stwierdził, że S100A8/A9 oraz S100A12 cechują się wysoką swoistością, VE-kadheryna jest natomiast markerem najbardziej czułym.

B. Stężenia uzyskane w próbkach z pierwszego pobrania krwi zestawiono z występowaniem zaostrzenia choroby podstawowej, wysokiej aktywności choroby oraz wzrostu wartości JADAS27 podczas drugiej hospitalizacji. We wszystkich powyższych przypadkach najwyższą wartość prognostyczną miało białko S100A12.

W oparciu o przeprowadzone badania oraz dokonane analizy autor przedstawił następujące wnioski:

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 obniżać 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.

Doktorant w swojej pracy podejmuje bardzo ważny problem wykorzystania biomarkerów jako elementów diagnostycznych MIZS, zarówno od strony praktycznej - klinicznej, jak i naukowej. Problematyka występowania biomarkerów, wykorzystania ich do przebiegu, odpowiedzi na leczenie oraz występowanie powikłań w MIZS to jeden z głównych nurtów doniesień naukowych w reumatologii dziecięcej.

Stężenia wszystkich biomarkerów ocenianych w niniejszej pracy były istotnie wyższe u pacjentów z MIZS niż u zdrowych rówieśników bez względu na etap zaawansowania choroby. Uzyskane wyniki dotyczące kalprotektyny oraz kalgranuliny C są zgodne z dostępnym piśmiennictwem. Wysoka czułość (87,5%) oznaczenia VE-kadheryny przy bardzo wysokiej swoistości białek S100A8/A9 i S100A12 wskazuje na możliwość stosowania ich w diagnostyce różnicowej u dzieci z podejrzeniem MIZS.

Wartości kalprotektyny i kalgranuliny C były wyższe u pacjentów z wysoką aktywnością choroby niż u pozostałych chorych.

Wartość predykcyjna oznaczenia S100A12 jest niezależna od stosowania GKS, co czyni z tego białka wiarygodny czynnik prognostyczny u pacjentów wymagających ich podaży. Pacjenci przyjmujący najwyższe dawki GKS – hospitalizowani z powodu świeżego rozpoznania MIZS lub zaostrzenia choroby podstawowej – mieli istotnie niższe stężenia VE-kadheryny niż dzieci będące w trakcie leczenia.

Trafnie odnotowanym przez autora ograniczeniem przedstawionego badania była znaczna różnorodność grupy badanej, co wynika przede wszystkim z heterogenności dzieci z rozpoznaniem MIZS, zespołu chorób a nie jednorodnej jednostki nozologicznej. Ponadto ocena odpowiedzi na leczenie modyfikujące przebieg choroby oraz pomiar stężeń biomarkerów powinny być wykonane w jednorodnych grupach pacjentów w miarę możliwości ze znacznym ograniczeniem wpływu czynników zewnętrznych mogących wpływać na wyniki badań.

Nowoczesne, znakomicie metodycznie opracowane doniesienie doktoranta budzi zainteresowanie naukowe, stanowiąc ważny wkład w rozwój badań naukowych w reumatologii dziecięcej, może pomóc w lepszym poznaniu procesu chorobowego MIZS.

Doniesienia dotyczące szeroko pojętej problematyki przebiegu MIZS, są głównym nurtem zainteresowań reumatologów dziecięcych na całym świecie. Ostatnie dwudziestolecie to absolutny przełom w reumatologii, nowa epoka, era leczenia biologicznego. Nowoczesna diagnostyka serologiczna, immunologiczna, molekularna a także obrazowa zmieniła oblicze reumatologii, w tym reumatologii dziecięcej.

Badania biochemiczne, serologiczne, immunologiczne stanowią podstawę wszelkich rozważań na temat przebiegu chorób reumatycznych zarówno u dorosłych jak i u dzieci. Wydaje się, że obecnie rola tych badań wzrasta szczególnie dlatego, że w związku z coraz lepszymi efektami leczenia dzieci chorujących na MIZS, konieczne jest poszukiwanie nowych biomarkerów aby coraz lepiej określić i przybliżyć zagrożenia płynące z przebiegu choroby a także zoptymalizować personalizację terapii w poszczególnych przypadkach zachorowań. MIZS to zespół chorobowy, właściwie heterogenna grupa chorób która w początkowym okresie może nie być w pełni zdefiniowana i dopiero w późniejszym etapie może spełniać kryteria jednostki chorobowej typowej dla wieku dorosłego. Niezwykle aktualnym wyzwaniem jest stale rosnąca grupa dzieci chorujących na MIZS wchodząca w dorosłość, jak wiemy z własnych doświadczeń jak i z licznych doniesień literaturowych, wczesne wykrycie MIZS i zastosowanie optymalnego schematu leczenia pozwala w większości przypadków uniknąć groźnych powikłań, kalectwa, niepełnosprawności, obniżenia jakości życia. Badania przeprowadzone przez Doktoranta wpisują się w ważną i stale aktualną problematykę diagnostyki i leczenia MIZS, najczęstszej artropatii wieku dziecięcego, najczęstszej przyczyny niepełnosprawności w wieku rozwojowym.

Rozprawa doktorska powstała w jednym z najważniejszych w Polsce, wiodącym ośrodku reumatologii dziecięcej w Klinice Kardiologii i Reumatologii Dziecięcej UM w Łodzi, pod opieką Promotora dr hab. n. med. prof. nadzw. Elżbiety Smolewskiej. Praca ma charakter pracy monograficznej na podstawie przeprowadzonego projektu badawczego,

Uwagi ogólne dotyczące pracy doktorskiej.

Praca liczy 100 stron formatu A-4. Układ pracy jest czytelny, bardzo dobrze opracowany graficznie, typowy dla prac doktorskich. Zawartość pracy doktorskiej stanowi zasadniczy tekst, 27 rycin, 9 tabel oraz spis tabel, spis rycin a także wykaz skrótów i oznaczeń. Praca zawiera 13 rozdziałów, poczynając od wstępu, kończąc na piśmiennictwie, spisie tabel i rycin. Poszczególne rozdziały zostały, ponumerowane, zapewniając dobrą przejrzystość pracy. Streszczenia zamieszczono na końcu pracy.

Uwagi odnoszące się do poszczególnych części rozprawy.

W rozdziale zatytułowanym „Wstęp”, Doktorant omawia zagadnienia związane z całościowym spojrzeniem na MIZS. W następnych rozdziałach poświęconych MIZS autor przedstawia podziały kliniczne oraz aktualnie obowiązujące zasady klasyfikacji. W kolejnej części rozdziału doktorant bardziej szczegółowo omawia definicję, etiopatogenezę objawy kliniczne oraz postaci kliniczne MIZS. W kolejnej części zostały omówione zagadnienia związane z listą wykluczeń, diagnostyką oraz zasadami leczenia i rokowaniem w MIZS.

Widoczne jest duże zainteresowanie doktoranta omawianą problematyką ze szczególnym uwzględnieniem problematyki biomarkerów w MIZS. Wszystkie aspekty związane z MIZS zostały omówione w sposób przystępny,

Doktorant w kolejnym rozdziale uzasadnia zasadność podjęcia własnych badań nad biomarkerami związanymi z MIZS, powiązanymi z przebiegiem choroby i jej leczeniem oraz wyodrębnieniem czynników złej prognozy i lepszej identyfikacji grup chorych o najcięższym przebiegu.

W rozdziale „Cele pracy” Doktorant przedstawia zasadnicze zagadnienia w postaci 6 głównych punktów, które omawia szczegółowo w dalszej części pracy, przedstawiłem je szerzej w części początkowej recenzji.

W rozdziale „Materiał i metodyka” przedstawione są kryteria włączenia i wyłączenia chorych do grupy badanej oraz omówione sposoby metodologii badania. W dalszej części adto przedstawiono metodykę analiz statystycznych.

Zasadniczą, największą treściowo i objętościowo część pracy przedstawiono w rozdziale „Wyniki” w którym zawarto uzyskane z analizy materiału badawczego dane. Każdy z analizowanych elementów jest też oceniany statystycznie.

Wyniki zostały przedstawione w postaci omówieni tekstowych a także ujęte zostały w tabelach oraz w postaci wykresów. Poszczególne kategorie wyników kolejno zostały omówione w poszczególnych podrozdziałach. Zebrane dane stanowią istotny przyczynek do rozważań nad lepszymi możliwościami diagnostyki i monitorowania przebiegu MIZS w oparciu o wykorzystanie nowoczesnych biomarkerów.

Doktorant w rozdziale zatytułowanym „Dyskusja” przedstawia uzyskane własne wyniki badania w odniesieniu do danych z literatury medycznej w zakresie poszczególnych elementów analizy dotyczącej wykorzystania biomarkerów w MIZS. Badania autora oraz innych prac potwierdzają zasadnicze tezy wynikające z analizy wykonanej w przedstawionej pracy, różnice znajduwane w obszernej dyskusji są właściwie przedstawione. Część różnic

może wynikać z różnic w zastosowanej metodyce badań, wielkości analizowanych kohort oraz typowych problemów z ustaleniem homogennych grup porównawczych w zagadnieniach dotyczących reumatologii dziecięcej. Podstawowe wyniki analizy dotyczące zastosowania biomarkerów w MIZS są porównywalne z obserwacjami światowymi jak również zgodne z danymi z literatury.

Jak w dysertacji podkreślił autor konieczne są dalsze badania nad omawianymi zagadnieniami w celu lepszego wykorzystania biomarkerów w codziennej praktyce klinicznej. W rozdziale „Wnioski” autor prezentowanej dysertacji doktorskiej, przedstawia odpowiedzi na założone pytania sformułowane w rozdziale „Cele pracy”.

W podsumowaniu Doktorant zawarł następujące wnioski:

- 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 obniżać 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.

Wnioski wypływające z wykonanej pracy stanowią wartościowe jej podsumowanie, wynikają z przeprowadzonej wnikliwej analizy zgromadzonego materiału źródłowego, świadczy o dużym zaangażowaniu autora w zamierzenie oraz dogłębnej znajomości zagadnień związanych z problematyką nowoczesnych biomarkerów MIZS.

Przedstawione i cytowane piśmiennictwo obejmujące 104 pozycje jest dobrane prawidłowo i potwierdza znajomość tematyki pracy przez lekarza Krzysztofa Orczyka.

Rolą recenzenta jest również ocena języka pracy doktorskiej. Staranne i przejrzyste przedstawienie złożonej tematycznie pracy stanowi o jej wartości pozamerytorycznej. Dbałość

o język polski zarówno w pracach naukowych, jak i w codziennym zastosowaniu jest ważnym aspektem każdej pracy podanej do publicznej wiadomości. Warto docenić wysoką jakość pracy Doktoranta także w tym zakresie.

PODSUMOWANIE RECENZJI.

Merytoryczną ocenę rozprawy doktorskiej podsumowuję bardzo dobrze, dysertacja stanowi istotny wkład w podniesienie wiedzy na temat diagnostyki i leczenia MIZS. Wkład autora w przeprowadzone wnikliwie badanie nowoczesnych biomarkerów: kalprotektyny (białko S100A8/A9) i kalgranuliny C (białko S100A12) – oraz kadheryny śródbłonkowej (VE-kadherynę) oraz szczegółowa analiza statystyczna stanowi o jej wysokiej pozycji w dotychczasowych badaniach nad zagadnieniami diagnostycznymi chorób reumatycznych u dzieci, wysiłek ten powinien być doceniony.

W poszczególnych fragmentach pracy widoczne jest duże zaangażowanie Doktoranta. Praca przedstawia niezwykle cenne obserwacje naukowe z niezwykle ważnym asumptem praktycznym. Jest napisana w sposób bardzo dobry, przystępny, bogato ilustrowany, różnorodne formy graficzne pozwalają lepiej odczytać intencje autora. Całościowo, zarówno praca, jak również użyty język przekazu w pełni odpowiadają wymaganiom stawianym tekstom naukowym.

Rozprawa doktorska lekarza Krzysztofa Orczyka spełnia warunki 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.)”.

Pracę oceniam bardzo wysoko, można ją uznać za wyróżniającą się.

Zwracam się do Szanownej Pani Przewodniczącej i Wysokiej Rady Naukowej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi o dopuszczenie lekarza medycyny Krzysztofa Orczyka do dalszych etapów przewodu na stopień doktora nauk medycznych.

Z wyrazami szacunku Zbigniew Żuber

Dr hab. Zbigniew Żuber prof. nadzw.

**SPECJALISTA CHOROBY DZIECI
SPECJALISTA REUMATOLOG**

1957889