

O C E N A

Rozprawa na stopień naukowy doktora nauk medycznych
w zakresie medycyny
lekarz Natalii Mikołajczyk-Korniak

”Porównanie oceny histopatologii i nieinwazyjnych metod diagnostycznych w rozpoznawaniu włóknienia wątroby u biorców przeszczepu wątroby”

Promotor: dr hab. n. med. Teresa Bączkowska

Zgodnie z uchwałą Rady I Wydziału Lekarskiego WUM z 20.06.2018 roku o powołaniu mnie na recenzenta wyżej wymienionej rozprawy, zgodnie z art. 13 Ustawy z dn. 14.03.2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2016 poz.882 z późn. zm.) mam zaszczyt przedstawić poniższą opinię.

Przedłożona do oceny praca obejmuje łącznie 135 stron tekstu, w tym 119 stron stanowi sama rozprawa. Rozprawa ma układ klasyczny, z czytelnym podziałem na rozdziały i podrozdziały wyszczególnione w spisie treści; przed rozdziałami wyodrębniono spis rycin (3 strony), i tabel (2 strony), wykaz stosowanych skrótów (3 strony), streszczenie w języku polskim (6 stron) oraz w angielskim (7 stron). W pracy umieszczono 33 tabele i 27 rycin.

Poszczególne rozdziały mają następujące proporcje: Wstęp – 26 stron, Cel pracy – 1 strona, Grupa badana i metody - 14 stron, Wyniki – 33 stron, Dyskusja – 11 stron, Podsumowanie wyników i wnioski - 2 strony.

Piśmiennictwo ułożone w kolejności cytowania, zawiera 140 pozycji; poza 2 publikacjami w języku polskim pozostałe są w języku angielskim; wśród nich blisko 70% stanowią publikacje z ostatniego dziesięciolecia.

Oceniając przedłożoną mi rozprawę na stopień doktora nauk medycznych, dokonam jej charakterystyki w zakresie:

1. Wartości celu badawczego
2. Poprawności metodycznej
3. Znaczenia naukowego i praktycznego wniosków wynikających z przeprowadzonych analiz.
4. Redakcji przedłożonej pracy

1. Wartość celu badawczego

Przeszczepienie wątroby jest jedyną skuteczną metodą leczenia niewydolności tego narządu. Rokowanie po przeszczepieniu wątroby jest coraz lepsze, rok po przeszczepieniu wątroby przeżywa około 90%% osób, zaś 5 lat – 75% biorców. Niestety po przeszczepieniu występować mogą różne powikłania, spośród których coraz większym problemem jest włóknienie graftu, który postępując powoli i skrycie doprowadzić może do przebudowy marskiej graftu i konieczności re-transplantacji. Dlatego tak bardzo istotne jest wyodrębnienie czynników ryzyka pozwalających ocenić wystąpienie włóknienia graftu, włączyć leczenie zapobiegające progresji tego zjawiska lub nawet doprowadzić do regresji marskości. Doktorantka uzasadniając temat podjętej pracy podkreśliła, że (tu cytata) „wiedza na temat przyczyn pogarszającej się funkcji narządu przeszczepionego, szczególnie tych podlegających modyfikacji, daje lekarzowi możliwość wdrożenia odpowiednich interwencji.”

We wstępie do rozprawy Doktorantka przedstawiła szczegółowo patogenezę włóknienia wątroby oraz aspekt odwracalności marskości wątroby. Kolejno Doktorantka opisała problem, jakim jest rozwój raka wątrobowokomórkowego, wyszczególniła czynniki ryzyka podkreślając, że głównym, niezależnym czynnikiem ryzyka HCC jest marskość wątroby.

Kolejno Doktorantka opisała historię przeszczepiania wątroby na świecie i w Polsce, zwróciła uwagę na wybrane czynniki mające wpływ na dobrą funkcję wątroby przeszczepionej (zależne zarówno od dawcy oraz niezależne od dawcy, a występujące po pobraniu narządu przeszczepianego).

Doktorantka przedstawiła doniesienia na temat nawrotu zakażenia HCV w przeszczepionym narządzie opisując objawy reinfekcji HCV, które mogą przebiegać przewlekłe pod postacią ciężkiego włókniejącego cholestatycznego zapalenia wątroby (Fibrosing Cholestatic Hepatitis - FCH). Doktorantka opisała zarówno obraz histopatologiczny jak również kryteria rozpoznania FCH, zwracając uwagę, że leczenie immunosupresyjne może zwiększać replikację wirusa, przyspieszając objawy reinfekcji HCV, która u osób po przeszczepieniu ma cięższy przebieg doprowadzając w przypadkach nieleczonych do dekompensacji graftu.

W kolejnej części pracy doktorantka wyczerpująco opisała włóknienie wątroby u chorych z infekcją HCV zwracając uwagę na mechanizmy uszkodzenia hepatocytów. Doktorantka podkreśliła, że w podejmowaniu decyzji terapeutycznych przy wdrożeniu leczenia przeciwwirusowego ważne jest oprócz genotypowania także określenie nasilenia włóknienia wątroby, przy czym najistotniejsza jest identyfikacja pacjentów z marskością. Doktorantka

podkreśliła znaczenia określenie rozległości (staging) rozmieszczenia tkanki łącznej w wątrobie celem wyznaczenia indywidualnej strategii postępowania z chorym.

W kolejnej części pracy Doktorantka opisała problem nawrotu zakażenia HBV w przeszczepionej wątrobie, oraz przedstawiła zalecenia dotyczące postępowania z pacjentami zakażonymi HBV w okresie oczekiwania na przeszczepienie wątroby oraz w okresie okołoperacyjnym i po transplantacji wątroby. Doktorantka opisała również nawrót chorób autoimmunologicznych w przeszczepionej wątrobie w tym pierwotną marskość żółciową-PBC, autoimmunologiczne zapalenie wątroby – AIH i pierwotne stwardniające zapalenie dróg żółciowych – PSC.

Nie wiem, czy w momencie pisania przez Doktorantkę pracy stosowane było już nowe nazewnictwo, ale aktualnie zamiast pierwotna marskość żółciowa proponuje się nowa nazwę, która pozwala utrzymać akronim PBC - primary biliary cholangitis. Nazwa ta została zaakceptowana przez Europejskie Towarzystwo Badań nad Wątrobą (EASL) w 2014 r. oraz Amerykańskie Towarzystwo Badań nad Wątrobą (AASLD) i Amerykańskie Towarzystwo Gastroenterologii (AGA) w 2015 r., a Sekcja Hepatologiczna Polskiego Towarzystwa Gastroenterologii i Endoskopii zaproponowała w 2017 r. „pierwotne zapalenie dróg żółciowych”, jako nową nazwę PBC w Polsce.

Podobnie aktualnie zaleca się stosowanie nazwy autoimmunizacyjne zapalenie wątroby (AIH) w miejsce autoimmunologicznego zapalenia wątroby (również utrzymując akronim AIH).

Kolejnym opisanym przez Doktorantkę zagadnieniem był problem alkoholowej choroby wątroby (ALD), który jest drugim najczęstszym wskazaniem do przeszczepienia wątroby zarówno w Europie, jak i w Stanach Zjednoczonych. Doktorantka przeanalizowała różne źródła literaturowe wskazując na dużą rozbieżność danych wskazujących, że do spożywania alkoholu po przeszczepieniu powraca od 7% do 95% pacjentów i podkreśliła, że w Polsce powinno się poświęcić więcej uwagi wsparciu psychologicznemu dla grupy chorych po przeszczepieniu wątroby z ALD w wywiadzie.

W kolejnej części wstępu doktorantka opisała uszkodzenie wątroby przeszczepionej z innych przyczyn, w tym powikłania żółciowe, powikłania naczyniowe, reakcję odrzucania wątroby przeszczepionej oraz rolę przeciwciał przeciwko antygenom dawcy we włóknieniu wątroby przeszczepionej. Doktorantka zwróciła uwagę na dane literaturowe podkreślające negatywny wpływ krążących przeciwciał przeciwko antygenom dawcy (donor specific antibody, DSA), na rozwój włóknienia wątroby. Doktorantka w oparciu o fakt, że krążące DSA uznawane są za niezależny, przewlekły czynnik progresji włóknienia wątroby podkreśla, że u pacjentów po

transplantacji wątroby należy z wielką rozwagą podejmować decyzję o redukcji leczenia immunosupresyjnego.

W kolejnej części wstępu Doktorantka szczegółowo opisała różne metody diagnostyczne włóknienia wątroby. Część tę Doktorantka rozpoczęła od szczegółowego opisanie znaczenia biopsji wątroby, wytycznych American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD), dotyczących wymiarów wycinka pobranego drogą biopsji gruboigłowej miarodajnego do oceny, skal stosowanych przez histopatologów do opisu zmian zapalnych i włóknienia (skale Scheuera, Ishaka, METAVIR, Knodella), możliwych powikłań po biopsji wątroby oraz ograniczeń związanych z tą metodą.

Doktorantka podkreśliła ograniczenia metody, jakim jest biopsja wątroby w związku z błędem próby (sampling error), wynoszącym od 1% do nawet 67%, jak też z różnicami w interpretacji tego samego wycinka przez kilku patologów, które mogą sięgać od 20-30%, do nawet 84%.

Doktorantka zwróciła uwagę, że przedmiotem analizy histopatologicznej są tylko pojedyncze fragmenty wątroby, które mogą nie być reprezentatywne dla pozostałego mięszu (w przybliżeniu oceniany jest skrawek wielkości 1/50 000 ogólnej masy wątroby).

Kolejną metodą diagnostyczną opisaną przez Doktorantkę była elastografia, metoda znajdująca coraz szersze zastosowanie w ocenie włóknienia wątroby nie tylko u pacjentów zakażonych HCV, dla których aktualnie metoda elastografii dynamicznej jest metodą rekomendowaną przez naukowe towarzystwa hepatologiczne w diagnostyce stopnia włóknienia wątroby, również przy kwalifikacji do leczenia WZW C. Doktorantka szczegółowo opisała elastografię statyczną oraz dynamiczną wskazując wady, zalety oraz przeciwwskazania do wykonywania w/w badań. Przedstawiła kryteria wiarygodnego wyniku elastografii, a także podkreśliła ograniczenia metody, czynniki zakłócające prawidłowy odczyt oraz zwróciła uwagę, że w przypadku, gdy w kolejnych próbach nie udaje się spełnić kryteriów wiarygodności wyników, lekarz interpretujący badanie powinien zaproponować inną, alternatywną metodę oceny stopnia włóknienia wątroby.

Doktorantka podsumowała literaturę na temat elastografii rezonansu magnetycznego. Jest to metoda, która charakteryzuje się najwyższą czułością, swoistością i powtarzalnością w pomiarze sztywności wątroby w porównaniu z innymi nieinwazyjnymi technikami obrazowania. Doktorantka podała, że w Polsce nie wykonuje się elastografii rezonansu magnetycznego, co nie do końca jest prawdą, gdyż od ponad roku metoda ta stosowana jest w IPCZD, (o czym oczywiście Doktorantka nie musiała wiedzieć).

W kolejnej części Wstępu Doktorantka opisała nieinwazyjne narzędzia oceny włóknienia wątroby, które podzieliła na dwie grupy: pośrednie markery (związane z czynnością wątroby) oraz bezpośrednie markery (oceniające składowe przebudowy macierzy zewnątrzkomórkowej). Doktorantka przeanalizowała szczegółowo pośrednie markery włóknienia wątroby wyliczane z algorytmów parametrów klinicznych i biochemicznych służące do przewidywania i różnicowania poszczególnych stadiów włóknienia a zwłaszcza FibroTest zwracając uwagę, że stosowanie FibroTestu rekomendowane jest celem nieinwazyjnej oceny włóknienia u chorych z przewlekłym wirusowym zapaleniem wątroby typu C przez Europejskie Towarzystwo Badań nad Chorobami Wątroby (EASL). Doktorantka słusznie podkreśliła zmniejszoną użyteczność powyższych testów u pacjentów po transplantacji, gdyż w tej grupie chorych elementy poszczególnych algorytmów mogą ulegać znacznym wahaniom niezależnie od przebiegu infekcji HCV i procesu włóknienia, a co związane jest to na przykład z pojawianiem się dyslipidemii wtórnie do działań ubocznych leków immunosupresyjnych (a także małopłytkowości związanej z hipersplenizmem).

Kolejno doktorantka opisała bezpośrednie markery włóknienia wątroby, takie jak między innymi Test ELF (Test Enhanced Liver Fibrosis), dla którego dla pacjentów będących po przeszczepieniu wątroby nie ma opracowanej metodyki interpretacji wyników. Doktorantka zwróciła uwagę, że pomimo to kwas hialuronowy (wchodzący w skład markerów włóknienia wątroby w teście ELF czy Hepascore) może być przydatny w celu wyselekcjonowania tych chorych, u których możemy spodziewać się nawrotu HCV w przeszczepionej wątrobie o ciężkim przebiegu. Poza kwasem hialuronowym Doktorantka zwróciła uwagę na inne bezpośrednie markery włóknienia wątroby jak aminokońcowy propeptyd prokolagenu typu III (PIIINP), inhibitor metaloproteiny 1 macierzy pozakomórkowej (TIMP-1), ludzka chrząstkowa glikoproteina (YKL-40), metaloproteinaza 2 macierzy zewnątrzkomórkowej, TGF- β 1 – transformujący czynnik wzrostu, lamininę, czy kolagen typu IV. Doktorantka przytoczyła badanie Carrion J. i wsp. gdzie stężenie biomarkerów bezpośrednich tj. kwasu hialuronowego, aminokońcowego fragmentu prokolagenu typu III i tkankowego inhibitora metaloproteiny-1 było znacząco wyższe w grupie pacjentów z szybszą progresją włóknienia w pierwszym roku po transplantacji, w porównaniu do pacjentów z powolnym postępem włóknienia w tym okresie. W oparciu o przegląd literatury Doktorantka podkreśliła, że reinfekcja HCV w przeszczepionej wątrobie wydaje się być najsilniejszym bodźcem do aktywacji włóknienia wątroby, a szósty miesiąc po transplantacji jest najbardziej odpowiednim punktem czasowym, w którym można za pomocą oceny stężeń bezpośrednich biomarkerów włóknienia zidentyfikować tych pacjentów, u których wystąpi szybsza progresja włóknienia,

wynikająca z nawrotu HCV. Doktorantka podkreśliła, że identyfikacja tego zagrożenia pozwoliłaby na włączenie odpowiednio wcześniej leczenia przeciwwirusowego w tej grupie chorych.

Celem pracy było porównanie metod diagnostycznych, oceniających nasilenie włóknienia wątroby przeszczepionej: biopsji gruboigłowej, jako metody referencyjnej, z elastografią dynamiczną oraz testami oceniającymi stężenie w surowicy pośrednich i bezpośrednich markerów włóknienia wątroby (FibroTest, test ELF).

Oceny dokonano poprzez:

1. Wyznaczenie najlepszej spośród ocenianych nieinwazyjnych metod oceny stopnia włóknienia wątroby.
2. Wyznaczenie dla każdej z nieinwazyjnych metod badawczych punktu odcięcia dla znacznego włóknienia ($F \geq 2$), zaawansowanego włóknienia ($F \geq 3$) i marskości wątroby ($F=4$) potwierdzonego w biopsji w odniesieniu do całej badanej grupy oraz w grupie pacjentów z marskością wątroby własnej o etiologii HCV.
3. Analiza potencjalnych czynników ryzyka włóknienia wątroby po transplantacji wątroby:
 - czynniki zależne od dawcy narządu: wiek i płeć, BMI, czas pobytu dawcy na OIT;
 - czynniki zależne od przeszczepionego narządu: uszkodzenie związane z rewaskularyzacją;
 - czas zimnego niedokrwienia (CIT);
 - czynniki związane z biorcą narządu: epizody ostrego odrzucania, infekcja CMV powikłania żółciowe i naczyniowe w okresie potransplantacyjnym;
 - powikłania metaboliczne: cukrzyca, nadciśnienie tętnicze, zaburzenia lipidowe, BMI biorcy.

2. Poprawność metodyczna

2.1 Materiał i metody

Ogromną zaletą pracy jest fakt, że badanie metod diagnostycznych włóknienia wątroby miało charakter prospektywny. Do badania prospektywnego przeprowadzonego w okresie od sierpnia 2014 roku do lutego 2016 roku doktorantka zakwalifikowała 62 dorosłych pacjentów po przeszczepieniu wątroby. Doktorantka szczegółowo podała przyczyny niewydolności wątroby własnej (ponownie stosując starą nomenklaturę dla PBC i AIH), medianę czasu od przeszczepienia.

Doktorantka w swojej pracy analizowała zarówno całą grupę badaną, jak też osobno pacjentów z wywiadem marskości wątroby własnej o dominującej w badanej grupie etiologii zakażenia HCV.

W celu wyznaczenia wartości referencyjnych Doktorantka posłużyła się retrospektywną analizą wyników 56 pacjentów, u których w biopsji graftu wątroby wykonanej rok po przeszczepieniu stwierdzono włóknienie w stadium $F \geq 2$. U chorych tych równocześnie z biopsją pobierano próbki krwi, które po odwirowaniu zamrożono. Doktorantka wykorzystała te próbki do oznaczeń markerów włóknienia. Jak zorientowałam się z rozdziału omawiającego wyniki, w grupie tej wykonano także badanie elastograficzne. Nie znalazłam jednak danych, dotyczących czasu wykonania badania w stosunku do momentu wykonania biopsji graftu. Mam nadzieję, że badanie wykonywano równocześnie, gdyż w innym przypadku badanie nie byłoby wiarygodne.

Doktorantka zgromadziła także grupę kontrolną, którą stanowiło 75 chorych, u których rok po transplantacji stwierdzono na podstawie biopsji brak włóknienia (F0) lub włóknienie F1. Obserwację tą Doktorantka prowadziła w grupie pacjentów z marskością wątroby własnej o etiologii HCV.

W badaniach Doktorantka oparła się na analizie chorych, którzy mieli wykonany zabieg transplantacji wątroby w Klinice Chirurgii Ogólnej i Transplantacyjnej Instytutu Transplantologii WUM oraz pozostawali pod stałą opieką lekarzy Kliniki Medycyny Transplantacyjnej, Nefrologii i Chorób Wewnętrznych Instytutu Transplantologii WUM.

Doktorantka przedstawiła kryteria wyłączenia z badania oraz załączyła zgodę Komisji Bioetycznej przy Warszawskim Uniwersytecie Medycznym (nr 129/2014) na jego przeprowadzenie. Odpis opinii Komisji Bioetycznej nr 129/2014 załączyła jako Załącznik nr 1 i umieściła na końcu pracy.

Doktorantka poddała analizie wyniki badań laboratoryjnych z okresu hospitalizacji pacjenta, wykonanych na czczo w przeddzień, bądź w dniu biopsji wątroby.

Doktorantka pozyskała informacje dotyczące dawcy wątroby: wiek, płeć, BMI, czas zimnego niedokrwienia (CIT), czas pobytu na OIT z danych zamieszczonych w Ustawowych Rejestrach Transplantacyjnych Centrum Organizacyjno-Koordynacyjnego ds. Transplantacji "POLTRANSPLANT"

Doktorantka zaznaczyła w pracy, że wszystkie biopsje wątroby przeprowadzono w Klinice Medycyny Transplantacyjnej, Nefrologii i Chorób Wewnętrznych Instytutu Transplantologii WUM, po uzyskaniu od pacjenta pisemnej zgody na zabieg. Biopsje były wykonywane ze wskazań lub wynikały z przyjętej w Klinice zasady nadzoru nad funkcją

narządu po transplantacji, jako tzw. biopsje protokolarne. Doktorantka opisała wskazania do biopsji poza tzw. biopsjami protokolarnymi zaznaczając, że szczególnym wskazaniem do wykonania biopsji było podejrzenie reinfekcji HCV w wątrobie przeszczepionej oraz kwalifikacja chorego do rozpoczęcia leczenia przeciwwirusowego.

Doktorantka opisała przyjęty sposób przygotowania pacjentów do biopsji wątroby, którzy przyjmowali kwas acetylosalicylowy (włączany standardowo po przeszczepieniu wątroby w profilaktyce HAT) a także w przypadku stwierdzenia małopłytkowości ≤ 70 tys., Nie wiem czy istnieją wytyczne i opracowane zostały standardy postępowania dokładnie ustalające liczbę płytek, przy których istnieje konieczność podania koncentratu krwinek płytkowych? Doktorantka opisała przygotowanie pacjenta jego ułożenie, nadzór po biopsji, sposób utrwalenia preparatu, barwienia oraz sposób oceny przez tego samego, doświadczonego histopatologa z Pracowni Histopatologii Kliniki Medycyny Transplantacyjnej, Nefrologii i Chorób Wewnętrznych Instytutu Transplantologii, który nie znał wyników elastografii ani wyników badań biomarkerów włóknienia.

Doktorantka zaznaczyła, że włóknienie wątroby analizowano przy pomocy ilościowych skal oceniających ten proces (*staging*). Do analizy w pracy Doktorantka użyła pięciostopniowej skali METAVIR (od F0 do F4).

Atrakcyjną stroną pracy było zamieszczenie rycin przedstawiających różne stadia włóknienia wątroby stwierdzane w wybranych wycinkach wątroby przeszczepionej pacjentów objętych badaniem w skali METAVIR od F0 do F4

Doktorantka zaznaczyła, że elastografię dynamiczną wykonano w okresie okołobiopsyjnym przy użyciu aparatu FibroScan® firmy Echosens w Pracowni Fibroscanu Wojewódzkiego Szpitala Zakaźnego w Warszawie oraz, że wzięto pod uwagę tylko te wyniki pomiarów, których wskaźnik sukcesu wynosił co najmniej 60% oraz odstęp międzykwartyłowy IQR (*Interquartile Range*) był mniejszy niż 30%. Wynik przedstawiono w kilopaskalach (kPa).

Zgodnie z założeniami projektu badania miały charakter prospektywny.

Metodyka badań została opisana przez Doktorantkę w sposób świadczący o jej dużej wiedzy teoretycznej oraz znajomości zasad pracy laboratoryjnej. Syntetycznie przedstawione zostały wykorzystane techniki laboratoryjne oraz metody badawcze. Bardzo ważną część stanowi statystyczne opracowanie uzyskanych wyników z wykorzystaniem odpowiednio dobranych testów i analiz.

Podsumowując stwierdzam, że zarówno plan pracy, jak i zastosowana metodyka badań oraz metody analizy statystycznej spełniają wszystkie kryteria dobrej praktyki klinicznej.

2.2 Wyniki

Jednym z najważniejszych celów projektu było porównanie metod diagnostycznych, oceniających nasilenie włóknienia wątroby przeszczepionej: biopsji gruboigłowej, jako metody referencyjnej z elastografią dynamiczną oraz testami opartymi o ocenę pośrednich i bezpośrednich markerów włóknienia wątroby obecnych w surowicy (FibroTest, test ELF).

Doktorantka opis wyników rozpoczyna od charakterystyki grupy badanej. Znaczną część danych z tego rozdziału należałoby według mnie umieścić w rozdziale „Grupa badana i metody” a w rozdziale „Wyniki” należałoby tylko skupić się na wynikach zgodnie z celami pracy.

W rozdziale „Wyniki” Doktorantka rozpoczyna ich omówienie od trzeciego punktu celów pracy (tj. od analizy potencjalnych czynników ryzyka włóknienia wątroby po transplantacji wątroby takich jak czynników zależnych od wieku, płci dawcy narządu, czasu pobytu dawcy na OIT). Proponuję, aby w przypadku publikacji wyników, do czego bardzo zachęcam, utrzymać kolejność omawianych wyników z kolejnością celów badania, co nada pracy większą przejrzystość.

Doktorantka w analizie jednoczynnikowej nie wykazała istotnej zależności ryzyka włóknienia wątroby po transplantacji od wieku, płci, CIT, czasu pobytu dawcy na OIT. Wyniki te zostały przedstawione w postaci czytelnych rycin i tabel. Następnie Doktorantka zajęła się problemem raka wątrobowokomórkowego w usuniętej wątrobie biorcy, (co wybiega poza określone wcześniej cele pracy).

Doktorantka w kolejnej części „Wyników” opisuje dobór grup krwi pomiędzy dawcą a biorcą, próbę krzyżową, leczenie immunosupresyjne, wiramię HCV, powikłania żółciowe, naczyniowe, infekcję CMV, epizody ostrego odrzucania oraz zaburzenia metaboliczne. Również część w/w danych według mnie powinna być zamieszczona w rozdziale „Grupa badana i metody”.

W kolejnej części „Wyników” Doktorantka ponownie opisała przygotowanie do biopsji wątroby, co jest niepotrzebnym powtórzeniem treści podanej w rozdziale „Grupa badana i metody” (strona 59).

Bardzo cenną częścią wyników jest analiza stężeń podstawowych parametrów funkcji syntetycznej wątroby w zależności od stopnia włóknienia ocenianego w biopsji w skali METAVIR w całej grupie badanej oraz wykazanie istotnych statystycznie różnic w zakresie

takich parametrów jak aktywność AST, ALT, GGTP, ALP i ATII u pacjentów ze stwierdzoną na podstawie biopsji marskością wątroby.

Na czytelnych, przejrzystych rycinach Doktorantka przedstawiła stężenia poszczególnych składowych testu ELF w zależności od stadium włóknienia wątroby. Doktorantka wykazała, że stężenia kwasu hialuronowego (HA), aminokońcowego propeptydu prokolagenu typu III (PIIINP) oraz inhibitora metaloproteinazy 1 macierzy pozakomórkowej istotnie statystycznie różniły się pomiędzy stadium włóknienia F0/1 a F2 oraz w różnicowaniu znacznego włóknienia wątroby od niższych stadiów.

W kolejnej części Wyników Doktorantka przedstawiła porównanie poszczególnych metod diagnostycznych w odniesieniu do biopsji wątroby. Są to niezwykle interesujące wyniki. Doktorantka wykazała, że włóknienie oceniane metodą FibroScanu w stadium wyższym niż F0 miało tendencję wzrostową wraz z nasileniem stadium włóknienia w biopsji. Podobne wyniki Doktorantka uzyskała w grupie pacjentów z marskością wątroby własnej o etiologii HCV. Włóknienie oceniane metodą METAVIR było niemal identyczne w grupach chorych, których w biopsji wątroby zaszeregowano, jako F0-1 lub F2, a wyraźny wzrost Doktorantka wykazała dopiero dla wariantów F3 i F4.

Doktorantka stwierdziła również, że wartość testu ELF wzrastała wraz ze stopniem nasilenia włóknienia w biopsji wątroby, za wyjątkiem stadium F0 a mediana wartości dla FibroTestu w grupie pacjentów z zakażeniem HCV nie miała liniowej tendencji wzrostowej dla poszczególnych etapów włóknienia wątroby w biopsji.

Dopiero w kolejnej części Wyników Doktorantka omówiła wyniki analizy dotyczącej punktu 1 i 2 celów szczegółowych. Doktorantka wyznaczyła wartości punktu odcięcia dla znacznego włóknienia ($F \geq 2$), zaawansowanego włóknienia ($F \geq 3$) i marskości wątroby ($F=4$) stwierdzonego w biopsji dla każdej z nieinwazyjnych metod badawczych dla całej badanej grupy oraz dla wyodrębnionej grupy pacjentów z marskością wątroby własnej o etiologii HCV. Doktorantka podjęła się także analizy wybranych czynników ryzyka progresji włóknienia wątroby do pierwszego roku od transplantacji w grupie pacjentów z marskością wątroby własnej o etiologii HCV. Również w tej części pracy istnieją powtórzenia dotyczące metodyki ze strony 56.

Doktorantka retrospektywnie przeanalizowała wyniki 56 chorych, u których w biopsji rok po przeszczepieniu wątroby stwierdzono włóknienie w stadium $F \geq 2$ w odniesieniu do grupy kontrolnej (75 pacjentów, u których rok po transplantacji stwierdzono w biopsji F0 lub F1).

Bardzo ciekawe są wyniki analizy wieloczynnikowej określonych wcześniej parametrów. Doktorantka wykazała zależność progresji włóknienia od stopnia $F \geq 2$ stwierdzonego na podstawie biopsji rok po transplantacji w przypadku współistnienia epizodu ostrego odrzucania oraz gdy jednocześnie biorcy przeszczepiono wątrobę od dawcy powyżej 45 roku życia. Ponadto, Doktorantka stwierdziła taką zależność w sytuacji, gdy czas zimnego niedokrwienia wynosił powyżej 8 godzin oraz w przypadku, gdy biorcą była kobieta i dawcą była również kobieta. Wykazała również związek progresji włóknienia w przypadku, gdy dawca miał powyżej 45 lat i jednocześnie u biorcy wątroby występowały epizody ostrego odrzucania, powikłania żółciowe oraz naczyniowe. Analiza wieloczynnikowa pozwoliła również na stwierdzenie istotnych statystycznie różnic między grupą kontrolną a badaną w zależności od czasu nawrotu HCV: do 6 miesiąca i do roku od transplantacji wątroby.

Cele pracy zrealizowano z wykorzystaniem różnorodnych testów statystycznych, w tym między innymi charakterystyki zmiennych ilościowych za pomocą klasycznych miar położenia i rozproszenia (między innymi: średnia, mediana, odchylenie standardowe, minimum, maksimum, współczynnik zmienności, wariancja, rozstęp, kurtoza, skośność oraz pierwszy i trzeci kwartył), testów: Shapiro-Wilka, Lilieforsa oraz Cramera-von Misesa, U Manna-Whitneya (test sumy rang Wilcoxon), χ^2 Pearsona. W statystyce opisowej dla zmiennych ilościowych posłużono się medianą. Wyznaczono również krzywe ROC, punkty odcięcia oraz pole pod krzywą, a do porównań zastosowano test DeLong'a. Rozkłady zmiennych ilościowych zaprezentowano na wykresach pudełkowych (*box-plot*). W przypadku zmiennych jakościowych zastosowano wykresy kolumnowe (*bar-plot*). Wyniki zostały zilustrowane licznymi, znakomitymi rycinami.

Podsumowując stwierdzam, że Doktorantka zrealizowała wszystkie założone cele badawcze. Uzyskane wyniki stały się podstawą do sformułowania w pełni uprawnionych wniosków, które doktorantka zawarła w odpowiednich podpunktach po ocenie poszczególnych zaplanowanych parametrów badawczych oraz po dyskusji. Drobne uchybienia redakcyjne nie umniejszają wartości omawianego fragmentu pracy.

3. Wartość naukowa i praktyczna wniosków wynikających z przeprowadzonych analiz.

Do 2017 roku, opublikowano tylko dwa prospective badania dotyczące populacji chorych po przeszczepieniu wątroby, w których oceniono przydatność stosowania bezpośrednich

markerów włóknienia wątroby z zastosowaniem testu ELF, w tym jedna praca dotyczyła populacji dziecięcej.

Zaletą pracy Doktorantki jest jej prospektywny charakter, a także nowatorskie i wszechstronne podejście do tematu.

Niezwykle cenna w pracy Doktorantki jest ocena nieinwazyjnych metod oceny przeszczepionej wątroby. Jak dotąd nieinwazyjne techniki diagnozowania włóknienia wątroby, tzw. „fizyczne”, takie jak elastografia dynamiczna oraz „biologiczne”, jak markery krążące w surowicy, będące produktami złożonego procesu włóknienia, zostały zwalidowane u pacjentów przed przeszczepieniem tego narządu. Testy te zostały uwzględnione w wytycznych EASL, jako metody alternatywne do biopsji w ocenie włóknienia wątroby u pacjentów przed jej transplantacją, brak natomiast takich prac dla pacjentów będących po transplantacji narządu.

Doktorantka, zdając sobie doskonale sprawę z ograniczeń pracy (mała i niejednorodna grupa, co wynikało z prospektywnego charakteru pracy, wpływ różnych zmiennych na wyniki testu), podjęła się bardzo trudnego zadania, mającego znaczenie praktyczne w prowadzeniu pacjentów po przeszczepieniu wątroby a także stymulującego do kolejnych badań z tego zakresu.

Wartościowym jest stwierdzenie przez Doktorantkę, że określenie „złoty standard” wydaje się być dla biopsji wyrażeniem nieodpowiednim, wobec wielu ograniczeń tego badania. Doktorantka stwierdza, że „biopsję należałoby raczej postrzegać, jako najdokładniej poznaną metodę służącą do oceny zmian w wątrobie”. Znaczenie praktyczne ma wniosek, że dopuszczalne będzie odstępianie od kolejnej biopsji protokolarnej wątroby w przypadku, gdy łącznie spełnione zostaną następujące warunki: (i) wyniki testów dla markerów pośrednich i bezpośrednich włóknienia są zbieżne i stabilne; oraz (ii) nie ma istotnej różnicy w pomiarze sztywności w kolejnych badaniach elastografii dynamicznej, w szczególności poniżej określonego punktu odcięcia dla identyfikacji znacznego włóknienia.

Doktorantka słusznie podkreśliła jednak, że wykonanie biopsji należy zawsze rozważyć przy podejrzeniu współwystępowania różnych etiologii uszkodzenia wątroby, a w szczególności, w przypadku podejrzenia u pacjenta braku adherencji w przyjmowaniu leków immunosupresyjnych.

Godna podkreślenia jest determinacja Doktorantki, aby badania były przeprowadzone zgodnie z odpowiednimi standardami metodologicznymi. Tu należy podkreślić wysiłek doktorantki, aby określić parametry referencyjne dla poszczególnych parametrów, co było związane z zastosowaniem metody porównawczej, w grupie chorych z wywiadem marskości wątroby własnej o etiologii HCV i dużej grupie kontrolnej, którą stanowili chorzy, u których w

biopsji wątroby wykonanej rok po przeszczepieniu nie stwierdzono klinicznie istotnego włóknienia wątroby (F0, F1).

Szczególnie cenną częścią prezentowanego badania jest określenie wartości odcięcia dla wyników badań nieinwazyjnych w grupie chorych po przeszczepieniu wątroby z różnymi wyjściowo przyczynami marskości wątroby własnej, w tym dla wyodrębnionej grupy z marskością w przebiegu zakażenia HCV. Według literatury, sugerowane progi mogą się różnić w zależności od etiologii choroby podstawowej, wielkości badanej populacji i jej wyjściowej charakterystyki. W prezentowanej pracy punkt odcięcia dla znacznego ($F > 2$) i zaawansowanego ($F \geq 3$) włóknienia w FibroScanie był niższy w grupie HCV, w porównaniu do mieszanej pod względem przyczyny marskości wątroby własnej, grupy pacjentów. Z kolei wartości te, w omawianych stadiach włóknienia oceniane w teście ELF były wyższe dla grupy HCV w porównaniu do całej badanej grupy.

Ciekawym jest spostrzeżenie dotyczące obniżonego stężenia haptoglobiny u 28,8% pacjentów, które nie było związane z procesem aktywnej hemolizy, (co oczywiście nie było tematem pracy Doktorantki, ale warte byłoby dalszych badań).

Podsumowując stwierdzam, że Doktorantka wykazała się zarówno dużą wiedzą teoretyczną, jak i praktyczną umiejętnością zastosowania odpowiednich metod badawczych. Doktorantka dokonała umiejętnej analizy wyników, przeprowadziła wnikliwą i dojrzałą dyskusję z wykorzystaniem właściwie dobranego piśmiennictwa oraz odniosła się krytycznie do ograniczeń wynikających z zastosowanych metod badawczych.

Mam nadzieję, że najbliższych planach Doktorantki jest przygotowanie publikacji w dobrych czasopismach zagranicznych, ponieważ uzyskane przez nią wyniki są nie tylko interesujące, ale mają też charakter pionierski.

4. Redakcja przedłożonej pracy

Omawiana praca doktorska stanowi przykład spójnej, niezwykle starannie przygotowanej dokumentacji naukowo-badawczej. Przejrzyste tabele i znakomite ryciny stanowią jej mocną stronę. Nie mam zastrzeżeń merytorycznych do recenzowanej pracy. Praca zawiera pojedyncze błędy redakcyjne i stylistyczno-ortograficzne, jednak te drobne błędy absolutnie nie obniżają wartości pracy i nie powinny wpłynąć na jej ogólną ocenę.

Drobne błędy i literówki (przykłady):

Strona 17: Zamiast MERTAVIR powinno być METAVIR

Strona 31: Zdanie „Pacjent z marskością wątroby utrzymujący abstynencję alkoholową może uzyskać poprawę badań laboratoryjnych, jednakże nie stanowi to potwierdzenia regresji

włóknienia” powinno brzmieć Pacjent z marskością wątroby utrzymujący abstynencję alkoholową może uzyskać poprawę wyników badań laboratoryjnych, jednakże nie stanowi to potwierdzenia regresji włóknienia..

Strona 36: aktualnie zamiast „pierwotna marskość żółciowa” proponuje się nowa nazwę: „pierwotne zapalenie dróg żółciowych”, która pozwala utrzymać akronim PBC - primary biliary cholangitis.

Strona 37: Zamiast „zacieki żółci” powinno być „wyciek żółci”.

Strona 58: w zdaniu „Poza przyjętym protokołem, wskazaniami do wykonania biopsji było: stwierdzenie niezadowalających cech czynności wątroby, wyrażające się podwyższoną aktywnością aminotransferaz (ALT i AST) i/lub wskaźników cholestazy (bilirubina całkowita, GGTP, ALP) „wskazane byłoby uzupełnienie: podwyższenie stężenia bilirubiny całkowitej z przewagą stężenia bilirubiny bezpośredniej, aktywności fosfatazy zasadowej i GGTP)”

Strona 58: W standardzie postępowania z pacjentem po przeszczepieniu wątroby, jako pierwsze badanie w celu oceny dróg żółciowych wykonuje się badanie USG jamy brzusznej a dopiero później badanie tomografii komputerowej, dlatego też zamieniłabym miejscami kolejność wymieniania wykonywanych badań w zdaniu ”Celem wykluczenia wymienionych patologii zlecano badanie tomografii komputerowej lub badanie USG jamy brzusznej z oceną przepływów w naczyniach wątroby, a w wybranych przypadkach rezonans magnetyczny celem dokładnej oceny dróg żółciowych” na „Celem wykluczenia wymienionych patologii zlecano badanie USG jamy brzusznej z oceną przepływów w naczyniach wątroby lub badanie tomografii komputerowej, a w wybranych przypadkach rezonans magnetyczny celem dokładnej oceny dróg żółciowych”.

Strona 84: zamiast: ”dla bilirubiny całkowitej...” - właściwsze byłoby określenie „dla stężenia bilirubiny całkowitej we krwi”.

Strona 112: niepotrzebny przecinek w zdaniu „Zjawisko to obserwowane jest w grupie chorych z wynikami podstawowych parametrów funkcji syntetycznej wątroby, mieszczących się w zakresach referencyjnych.

WNIOSKI KOŃCOWE

Biorąc pod uwagę aspekt naukowy pracy, w tym nowatorskie podejście, wartość merytoryczną projektu i staranną szatę graficzną oceniam pracę ”Porównanie oceny histopatologii i

nieinwazyjnych metod diagnostycznych w rozpoznawaniu włóknienia wątroby u biorców przeszczepu wątroby” lekarz Natalii Mikołajczyk-Korniak, jako w pełni spełniająca wymagania stawiane rozprawom na stopień doktora nauk medycznych w zakresie medycyny. Rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 13 Ustawy z dn. 14.03.2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2016 poz.882 z późn. zm.) mam zaszczyt przedstawić poniższą opinię.

Na tej podstawie zwracam się do Wysokiej Rady I wydziału Lekarskiego WUM w Warszawie z wnioskiem o dopuszczenie lekarz Natalii Mikołajczyk-Korniak do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ponadto, doceniając walory naukowo-poznawcze pracy oraz ogromną staranność i nowatorskie podejście w prowadzeniu badań, jak również praktyczne znaczenie uzyskanych wyników i wniosków z ogromną przyjemnością stawiam wniosek o wyróżnienie.

Prof. dr hab. n. med. Irena Jankowska

Warszawa, 21 lipca 2018 r.

Prof. dr hab. n. med. Irena Jankowska
Pediatria Gastroenterolog
Gastroenterolog dziecięcy
Transplantolog kliniczny
2174656

