

Recenzja

**rozprawy na stopień doktora nauk medycznych lek. med. Natalii Mikołajczyk-Korniak
pt. „Porównanie oceny histopatologii i nieinwazyjnych metod diagnostycznych w
rozpoznawaniu włóknienia wątroby u biorców przeszczepów wątroby”**

Przeszczepienie wątroby zostało uznanym sposobem leczenia chorych ze schyłkową niewydolnością wątroby po konferencji dotyczącej transplantacji tego narządu w Bethesda w 1983 r czyli 20 lat po wykonaniu pierwszego przeszczepu przez Thomasa Starzla. Od tego czasu stosunkowo szybko wzrasta liczba wykonywanych transplantacji na świecie skutkując narastającą dysproporcją pomiędzy liczbą dostępnych narządów a liczbą oczekujących na przeszczep. Brak możliwości zapewnienia wykonania transplantacji w odpowiednim czasie stwarza ryzyko zgonu potencjalnych biorców wątroby. Istotnym elementem również jest takie planowanie transplantacji aby wyniki przeżycia biorców i przeszczepów były podobne niezależnie od wskazania do transplantacji, a nie tylko szansą na wydłużenie życia. Nawrót choroby podstawowej w wielu przypadkach decyduje o czasie przeżycia przeszczepianego narządu. Do niedawna dotyczył przede wszystkim biorców wątroby zakażonych wirusem typu C u których szansa nawrotu zakażenia wynosiła 100% a prawie u połowy dochodziło do ponownego procesu marskiego zwykle w krótszym czasie niż w wątrobie natywnej. Wprowadzone od kilku lat do kliniki nowe leki o bezpośrednim działaniu przeciw wirusowym prawdopodobnie wyeliminują problem nawrotu tego zakażenia u biorców wątroby natomiast w przypadku innych czynników etiologicznych ryzyko nawrotu choroby ciągle kształtuje się na tym samym poziomie i wpływa na organicznie długoletniego przeżycia zarówno narządów jak i biorców.

Niezależnie od czynnika etiologicznego zwykle ostatecznym stadium przewlekłej choroby wątroby jest proces marski, którego głównym wykładnikiem jest nasilone włóknienie związane z odpowiedzią zapalną. Komórki gwiazdziste wątroby w odpowiedzi na czynnik uszkadzający ulegają procesowi aktywacji i przemodelowaniu na komórki zbliżone do fibroblastów produkujące kolagen. Biorą aktywny udział w procesie gojenia z wytworzeniem nadmiaru macierzy zewnątrzkomórkowej i następowego włóknienia mięszu wątrobowego. Po przeszczepie wątroby poza nawrotem choroby podstawowej dochodzą inne czynniki mogące wyzwolić reakcję zapalną (np. DSA) z następowym nasileniem włóknienia.

W początkowym okresie włóknienie jest najczęściej bezobjawowe i zwłaszcza na tym etapie stwarza szanse na odwrócenie procesu nadmiernej produkcji macierzy lub jego stabilizację. Monitorowanie funkcji wątroby jest niezbędnym elementem w nadzorowaniu biorców po przeszczepie również w aspekcie włóknienia.

Wybór tematu rozprawy przez doktorantkę w postaci porównania nieinwazyjnych metod oceny stopnia włóknienia wątroby przeszczepionej w odniesieniu do wyników biopsji gruboigłowej jest w pełni uzasadniony. Biopsja gruboigłowa

wątroby z patomorfologiczną oceną jest najbardziej obiektywną metodą diagnostyczną dla włóknienia ale zawsze wiąże się z pewnym ryzykiem powikłań w postaci krwawienia, krwaka i zakażenia i powinna odbywać się w trybie hospitalizacji pacjenta.

Zasadniczym celem pracy było wyznaczenie najdokładniejszej metody nieinwazyjnej oceny stopnia włóknienia z wyznaczeniem punktów odcięcia dla poszczególnych stopni włóknienia ocenianego na podstawie biopsji gruboigłowej w skali METAVIR. Doktorantka wybrała do oceny elastografię dynamiczną oraz dwa testy oznaczanych w surowicy krwi markerów włóknienia: Fibrotestu i testu ELF.

Cel drugorzędny stanowiła analiza retrospektywna czynników mających potencjalnie wpływ na proces włóknienia przeszczepionej wątroby zależnych od dawców i biorców.

Przeprowadzone badanie oceny stopnia włóknienia miało charakter prospektywny i dotyczyło grupy 62 biorców wątroby u których wykonano biopsje wątroby, elastografię dynamiczną oraz nieinwazyjne testy surowicy krwi. Autorka wydzieliła do analizy również grupę chorych z zakażeniem HCV jako najczęstszą przyczyną nawrotu choroby w wątrobie przeszczepionej.

Doktorantka wykazała na podstawie przeprowadzonej analizy krzywych ROC że najbardziej optymalną metodą nieinwazyjnej oceny zaawansowanego stopnia włóknienia wątroby przeszczepionej jest elastografia dynamiczna z wyraźnie narastającymi punktami odcięcia dla poszczególnych stadiów włóknienia ocenianych w badaniu patomorfologicznym ($F \geq 2$, $F \geq 3$, $F = 4$) z wysoką czułością i swoistością badania zarówno w całej grupie jak i w grupie biorców HCV. Natomiast test ELF wydaje się być metodą najlepszą dla oceny wczesnego stadium włóknienia ($F \geq 2$) spośród analizowanych metod nieinwazyjnych z największą wartością pola pod krzywą dla tego stadium w analizie ROC. Wszystkie jednak metody nieinwazyjne obarczone są błędem i nie pozwalają zastąpić całkowicie badania patomorfologicznego co autorka podkreśla we wnioskach.

W retrospektywnej analizie potencjalnych czynników ryzyka dla wystąpienia włóknienia w wątrobie przeszczepionej u biorców HCV pozytywnych jako punkt końcowy

doktorantka wybrała obecność włóknienia $F \geq 2$ w skali METAVIR. W analizie jednoczynnikowej wybranych przez siebie cech charakterystycznych dla dawców i biorców jak również czasu zimnego niedokrwienia autorka nie znalazła istotnych zależności. W analizie wieloczynnikowej ciekawym spostrzeżeniem było wykazanie zależności progresji włóknienia od epizodu ostrego odrzucania w wątrobach pochodzących od dawców powyżej 45 r.ż. Na podstawie analizy wieloczynnikowej nie udało się autorce wykazać żadnego (spośród wybranych) niezależnego czynnika wpływającego na włóknienie wątroby u biorców HCV pozytywnych.

Omówienie rozprawy doktorskiej

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska lekarza medycyny Natalii Mikołajczyk-Korniak w postaci oprawionego wydruku formatu A4 liczy 135 ponumerowanych stron. W tekście umieszczono 33 tabele i 25 rycin oraz spis piśmiennictwa ułożonego według kolejności cytowanych prac obejmujący 140 pozycji. Praca ma układ typowy i składa się z 5 zasadniczych rozdziałów: wstępu, celu pracy, materiału i metodyki, wyników oraz dyskusji zakończonej 4 wnioskami. Przed wstępem umieszczono spis: rycin, tabel, spis używanych w tekście skrótów, streszczenia w języku polskim i angielskim, , na końcu pracy umieszczono spis piśmiennictwa oraz opinię komisji bioetycznej.

We wstępie na 26 stronach Doktorantka omawia zagadnienia związane: z patogenezą włóknienia wątroby, w tym również w skrócie zagadnienie raka wątrobowokomórkowego, transplantacji wątroby. W dalszym ciągu przedstawia stan dotychczasowej wiedzy w oparciu o piśmiennictwo na temat nawrotu choroby podstawowej w przeszczepionej wątrobie. Najważniejszą część wstępu dotyczącą diagnostyki włóknienia wątroby autorka omawia w sposób szczegółowy i wyczerpujący. Tak wnikliwy wstęp świadczy o dobrej znajomości problematyki badania przygotowanego przez Doktorantkę.

W rozdziale cel pracy - cel zasadniczy został jasno określony jak również cele szczegółowe dotyczące badania prospektywnego, natomiast wśród celów szczegółowych dotyczących analizy czynników ryzyka włóknienia po transplantacji wątroby niejasne jest określenie – *czynniki zależne od przeszczepianego narządu: uszkodzenie związane z rewaskularyzacją*. Autorka nie precyzuje co będzie analizować ani nie ma odniesienia dla tego celu w wynikach.

W rozdziale Grupa Badana i Metody zostały omówione zasady rekrutacji chorych do prospektywnego badania oraz kryteria kwalifikacyjne pacjentów do badania retrospektywnego. Dalej autorka określiła kryteria wyłączenia, w których brakuje w mojej

opinii: powikłań naczyniowych, zastosowania drenażu dróg żółciowych lub protezowania dróg żółciowych, które potencjalnie mogą wpływać na wynik elastografii dynamicznej co zresztą doktorantka wspomina w dyskusji. W dalszej części rozdziału opisuje dokładnie metodykę biopsji z przykładowymi obrazami stopnia włóknienia w skali METAVIR, sposób wykonania elastografii dynamicznej oraz testów: ELF i Fibrotestu. Rozdział kończy opis zastosowanych metod statystycznych.

W pierwszej części rozdziału Wyniki autorka przedstawiła charakterystykę chorych w całej grupie i w podgrupie chorych z HCV dla badania prospektywnego.

Następnie przedstawiono wyniki analizy jednoczynnikowej wybranych potencjalnych czynników ryzyka na włóknienia w postaci: wieku, płci, BMI dawców, czasu pobytu dawcy w OIT, płci, BMI cukrzycy, nadciśnienia tętniczego u biorców podzielonych na dwie podgrupy ze stopniem włóknienia $F < 2$ i $F \geq 2$ w skali Metavir dla bioptatów wątroby.

W dalszej części na podstawie trafnie dobranych metod statystycznych autorka przedstawiła różnice i stopień narastania wartości dla Fibroscanu, oraz testów ELF i Fibrotestu. Dla części prospektywnej wyniki kończą się analizą krzywych ROC i wyznaczeniem punktów odcięcia dla poszczególnych istotnych klinicznie stadiów włóknienia ($F \geq 2$, $F \geq 3$, $F = 4$), które przedstawiono w tabelach i na wykresach.

Rozdział kończy przedstawienie retrospektywnych danych charakterystyki grupy biorców i dawców i ich wieloczynnikową analizę dla oceny czynników ryzyka włóknienia w stopniu $F \geq 2$ ocenianego w skali Metavir. Charakterystykę przedstawiono w formie tabeli a wyniki analiz w formie wykresów.

W dyskusji Doktorantka porównuje uzyskane wyniki z wynikami prezentowanymi w piśmiennictwie przez innych autorów wykazując istotną rolę stosowania nieinwazyjnych testów w ocenie włóknienia wątroby przeszczepionej. Dyskusja napisana jest sposobem jasnym i logicznym. Bardzo istotnym podrozdziałem dyskusji są przeanalizowane ograniczenia pracy. Za najważniejszą korzyść wynikającą z przeprowadzonego badania jest wyznaczenie punktów odcięcia dla poszczególnych testów zależnie od stopnia włóknienia, które wymagają walidacji i mogą być przyczynkiem do dalszych badań. Pracę kończą cztery wnioski sformułowane w oparciu o uzyskane wyniki.

W tekście cytowanych jest 140 pozycji piśmiennictwa, odpowiednio dobranego i aktualnego z uwzględnieniem rodzimych pozycji.

Praca napisana jest w sposób przejrzysty, poprawną polszczyzną. Zaprojektowane tabele i ryciny ułatwiają zapoznanie się z uzyskanymi wynikami oraz ich interpretacją.

Uwagi recenzenta

Z obowiązku recenzenta pozwalam sobie na zwrócenie uwagi na pewne nie umniejszające wartości przedstawionej do oceny pracy szczegóły mogące się przydać w przygotowaniu przez Doktorantkę publikacji:

1. W mojej ocenie zarobkowe badanie prospektywne i analiza jego wyników samo w sobie jest wystarczające dla dysertacji na stopień doktora nauk medycznych część dotycząca oceny czynników ryzyka dla włóknienia wątroby oparta o analizę retrospektywną może stanowić odrębną publikację zwłaszcza po zwiększeniu liczby przypadków np. w badaniu wieloośrodkowym.

Wstęp:

1. Wstęp jest zbyt obszerny zawiera szereg informacji dodatkowych nie wiążących się z tematyką prowadzonych badań m.in.: dane historyczne dotyczące transplantacji wątroby czy zagadnienie raka wątrobowokomórkowego.
2. Z punktu widzenia chirurga we wstępie znalazłem niepokojącą informację o wpływie wydłużenia czasu ciepłego niedokrwienia o 1 min na zwiększenie ryzyka wystąpienia powikłań żółciowych o 16%, informacja ma odnośnik w piśmiennictwie i dotyczy dawców wątroby po zatrzymaniu krążenia czego autorka nie doprecyzowała w tekście.

Grupa Badana i Metody:

1. Brak informacji na temat minimalnego czasu od przeszczepu do badania. Autorka określiła tylko medianę.
2. Brak informacji skąd pozyskano dane dotyczące dawców i biorców wykorzystanych do retrospektywnej analizy

Wyniki:

1. Brak analizy porównawczej cech charakterystycznych dla całej grupy i podgrupy chorych z HCV oraz brak analogicznej analizy grupy badanej i kontrolnej dla retrospektywnej badania. Wartości zmiennych autorka przedstawiła w postaci mediany i odchylenia standardowego, które przekracza często wartość mediany. Połączyła medianę z odchyleniem standardowym zamiast z wartościami kwartyli, nie podając również zakresu wartości zmiennych.
2. W badaniach porównawczych dla nieinwazyjnych testów włóknienia wątroby wzięto pod uwagę pacjentów ze stopniem włóknienia F4, ale było ich tylko 2 zarówno w całej grupie jak i w grupie HCV. Tak mała liczba przypadków nie powinna być brana pod uwagę w analizach statystycznych.

3. Przeprowadzona analiza jednoczynnikowa dla oceny ryzyka włóknienia została przeprowadzona na podstawie danych dotyczących pacjentów uczestniczących w badaniu prospektywnym, mimo że, w rozdziale o metodach autorka napisała: *do zbadania przyczyn włóknienia wątroby w pierwszym roku po jej transplantacji posłużono się retrospektywną analizą*

4. Nie znalazłem w pracy wyników analizy Delong dla krzywych ROC (pola pod krzywą) mimo informacji o zastosowaniu tego testu statystycznego do ich porównania w rozdziale o metodach.

Podsumowanie wyników i wnioski

1. W mojej opinii wnioski są za długie i wymagają przeredagowania taka forma to podsumowanie wyników, które można przenieść do dyskusji.

2. We wniosku 4 informacja, że istnieje trend dla wystąpienia włóknienia w stopniu $F \geq 2$ dla ocenianych czynników ryzyka przy przyjętym poziomie istotności i wartościach p dalekich od 0,05 jest błędna.

Pod względem edytorskim brakuje na wykresach odpowiednich legend dla określenia czy wartości przedstawione to np. mediana a rozrzut to odchylenie standardowe czy też kwartyle. Brakuje również znaczników dla wartości istotnie różnych z ich objaśnieniem. Pozostałe drobne jak np. na str. 30 zamiast proteaz jest protez nie mają większego znaczenia.

Powyższe uwagi nie ujmują wartości merytorycznej pracy a są jedynie wskazówką, którą należałoby uwzględnić przygotowując manuskrypt do publikacji.

Reasumując rozprawę doktorską lek. med. Natalii Mikołajczyk-Korniak jako całość oceniam pozytywnie i stwierdzam, że spełnia ona wszystkie ustawowe wymogi stawiane rozprawom doktorskim. Przedkładam wobec powyższego Wysokiej Radzie I Wydziału Lekarskiego Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego w Warszawie wniosek o dopuszczenie ww. do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Dr hab.n. med. Robert Król

Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach
Katedra i Klinika Chirurgii Ogólnej,
Naczyniowej i Transplantacyjnej
40-027 Katowice, ul. Francuska 20/24
tel./f: x 032 -255-50-52

KIEROWNIK
Katedra i Klinika Chirurgii Ogólnej,
Naczyniowej i Transplantacyjnej
Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach
dr hab. n. med. Robert Król