

Bydgoszcz, dnia 22.11.2022r.

O C E N A

rozprawy doktorskiej lek.med. Kamila Janowskiego

**„Nieinwazyjne markery stłuszczenia, włóknienia i zapalenia wątroby u dzieci
z autoimmunizacyjnymi chorobami wątroby”**

W ostatnich latach odnotowuje się wzrost liczby chorób wątroby w populacji dziecięcej a diagnoza autoimmunizacyjnego zapalenia wątroby (AIH) stawiana jest w ok. 10% przypadków u dzieci hospitalizowanych z powodu patologii wątroby. Rozpoznanie autoimmunizacyjnych chorób wątroby opiera się na ocenie obrazu klinicznego, badaniach biochemicznych, serologicznych oraz charakterystycznym obrazie histopatologicznym wątroby, a w przypadku autoimmunizacyjnego stwardniającego zapalenia dróg żółciowych (ASC) dodatkowo na obrazowaniu dróg żółciowych.

Biopsja wątroby stanowi złoty standard w diagnostyce chorób wątroby, także u dzieci. Jest konieczna do potwierdzenia rozpoznania AIH lub ASC oraz oceny skuteczności leczenia i monitorowania przebiegu choroby. W populacji pediatrycznej wykonanie biopsji często wiąże się z koniecznością wykonania znieczulenia ogólnego. Powyższe względy są przyczyną poszukiwania nowych nieinwazyjnych metod diagnostycznych, zarówno obrazowych jak i w postaci markerów surowiczych, przydatnych w ocenie stopnia uszkodzenia wątroby celem ograniczenia wykonywania inwazyjnej biopsji wątroby.

Podjęcie przez Doktoranta tematyki analizy wybranych surowiczych markerów: cytokeratyny-18 (CK18), kwasu hialuronowego (HA), czynnika różnicowania wzrostu-15 (GDF15), lamininy (LN) białka C3 (pro-C3), FIB-4, APRI, ALT, AST, w ocenie stłuszczenia, zapalenia i włóknienia wątroby, zbadanie przydatności obrazowania metodą wieloparametrycznego rezonansu magnetycznego (mpMRI) i cholangiopankreatografii rezonansu magnetycznego z ilościową oceną dróg żółciowych (MRCP+) w diagnostyce i monitorowaniu postępu choroby oraz metody MRCP+ w różnicowaniu ASC i AIH u dzieci

z autoimmunizacyjnymi chorobami wątroby w porównaniu do biopsji wątroby uważam za bardzo trafne i zasadne, zwłaszcza w kontekście niewielkiej liczby oryginalnych prac klinicznych dotyczących tej tematyki. Należy także podkreślić, że ośrodek, w którym przeprowadzono badania jest wiodącym w Polsce w kontekście diagnostyki i leczenia chorób wątroby u dzieci, w tym także o podłożu autoimmunizacyjnym, a część badania dotycząca analizy techniki mpMRI przeprowadzona była w ramach międzynarodowego wieloośrodkowego obserwacyjnego badania klinicznego.

Przedstawiona mi do recenzji praca jest próbą odpowiedzi na pytania:

- 1) czy surowicze markery: laminina, CK18, GDF15, HA, pro-C3, APRI i FIB-4 mogą być przydatne w ocenie uszkodzenia wątroby w porównaniu do biopsji wątroby i standardowych parametrów funkcji wątroby u dzieci z autoimmunizacyjnymi chorobami wątroby?
- 2) czy metoda mpMRI jest pomocna w diagnostyce autoimmunizacyjnych chorób wątroby u dzieci oraz czy jest przydatna w ocenie uszkodzenia wątroby i odpowiedzi na leczenie w odniesieniu do biopsji wątroby u dzieci z autoimmunizacyjnymi chorobami wątroby?
- 3) czy metoda MRCP+ jest przydatna w diagnostyce i monitorowaniu postępu choroby oraz różnicowaniu AIH i ASC u dzieci?

Praca obejmuje 106 stron maszynopisu w układzie typowym dla tego typu prac.

W przedstawionym na 16 stronach wprowadzeniu, w pierwszej jego części Doktorant przedstawia klasyfikację autoimmunizacyjnych chorób wątroby u dzieci oraz definicje i kryteria rozpoznania poszczególnych jednostek chorobowych. Szeroko opisuje kryteria diagnostyczne AIH i ASC uwzględniając ich kolejne modyfikacje z uwzględnieniem rekomendacji Międzynarodowego Komitetu Ekspertów Autoimmunizacyjnego Zapalenia Wątroby. Następnie omawia epidemiologię i przebieg kliniczny AIH i ASC oraz odrębności kliniczne tych schorzeń u dzieci. W kolejnym podrozdziale koncentruje się na cechach histopatologicznych AIH wskazując na jego typowe cechy w postaci przekraczania blaszki granicznej przez nacieki zapalne, rozet hepatocytarnych i emperipolesis.

Przedstawia aktualne zasady leczenia w autoimmunizacyjnych chorobach wątroby oraz kwalifikacji do transplantacji wątroby.

W dalszej części wprowadzenia Doktorant obszernie omawia rolę przezskórnej biopsji w diagnostyce chorób wątroby. Wskazuje, że biopsja wątroby jest konieczna do potwierdzenia rozpoznania AIH lub ASC oraz oceny skuteczności leczenia i monitorowania przebiegu choroby. Szczegółowo przedstawia najważniejsze przeciwwskazania do wykonania biopsji wątroby jak też ryzyko wystąpienia określonych powikłań. Wskazuje, że u dzieci poza

ryzykiem wynikającym z inwazyjności zabiegu, należy wziąć pod uwagę ryzyko związane z przeprowadzeniem znieczulenia ogólnego oraz uwzględnić tzw. błąd próbkowania.

Następnie opisuje rolę wybranych surowiczych markerów: HA, CK18, GDF15, pro-C3 oraz wskaźnika FIB-4 i APRI w monitorowaniu stopnia włóknienia oraz LN i HA w wykrywaniu uszkodzeń wątroby.

Doktorant wskazuje też na możliwości oceny wątroby w nieinwazyjnych badaniach obrazowych. Przedstawia obrazowanie metodą wieloparametrycznego rezonansu magnetycznego (mpMRI), które wykazało przydatność w klinicznej ocenie chorób wątroby u dorosłych. Wskazuje również, że ilościowa ocena dróg żółciowych metodą rezonansu magnetycznego (MRCP+) umożliwia ocenę monitorowania autoimmunizacyjnych chorób wątroby w populacji pediatrycznej.

Całość stanowi znakomite wprowadzenie w temat badawczy, świadcząc o szerokiej wiedzy Doktoranta w zakresie omawianej problematyki.

Założenia i cel pracy zostały sformułowane prawidłowo, metody i narzędzia badawcze dobrano trafnie.

Rekrutację pacjentów przeprowadzono wśród dzieci w wieku 6–18 lat, pozostających pod opieką Kliniki Gastroenterologii, Hepatologii, Zaburzeń Odżywiania i Pediatrii IPCZD.

Badanie przeprowadzono w kilku etapach w grupach o różnej liczebności. Analizę danych podzielono na 3 etapy zależnie od ocenianych biomarkerów:

- 1) analiza dotycząca nowych nieinwazyjnych markerów surowiczych, FIB-4 i APRI (badanie nr 1),
- 2) analiza dotycząca techniki mpMRI (badanie nr 2),
- 3) analiza dotycząca techniki MRCP+ (badanie nr 3).

Do badania nr 1 zrekrutowano 108 dzieci (44 dziewczynki i 42 chłopców w wieku 6-18 lat) z chorobą wątroby (57 dzieci z AIH, 14 z ASC, 6 z choroba Wilsona, 2 z NAFLD i 7 z inną chorobą wątroby) oraz 22 dobranych wiekowo zdrowych dzieci, które utworzyły grupę kontrolną. Grupę badaną stanowiły dzieci z autoimmunizacyjnymi chorobami wątroby AIH (n=57) i ASC (n=14).

W grupie badanej wykonano podstawowe badania biochemiczne, biopsję wątroby z analizą histopatologiczną, ocenę markerów surowiczych: GDF15, CK18, pro-C3, HA, LN, oraz wyliczanych: FIB-4, APRI.

Do oceny stężenia CK18, HA, GDF15, pro-C3 i LN zastosowano zestawy ELISA. FIB-4 i APRI wyliczono zgodnie z obowiązującymi wzorami.

Do badania nr 2 włączono 81 uczestników, w tym do grupy badanej 60 dzieci z AIH w wieku 13.4 ± 3.7 lat oraz 21 zdrowych dzieci w wieku 11 ± 3.7 lat jako grupę kontrolną

W grupie badanej wykonywano biopsję wątroby w ramach rutynowego postępowania diagnostycznego lub monitorowania choroby oraz badanie mpMRI w ramach wieloośrodkowego prospektywnego obserwacyjnego badania klinicznego pt. "Assessing Kids for Liver Inflammation and Fibrosis Using Non-invasive MRI (Kids4LIFe)".

Badanie MR wykonano w Zakładzie Diagnostyki Obrazowej IPCZD z użyciem rezonansu magnetycznego 1,5T Siemens Avanto^{fit} (Siemens Healthineers, Niemcy) zgodnie z protokołem LiverMultiScan (Perspectum, Oxford, UK).

Przebieg badania dokładnie odzwierciedla zamieszczona prezentacja graficzna protokołu.

Do badania nr 3 włączono 66 uczestników: 52 z AIH i 14 z ASC, u których analizowano następujące dane:

- parametry biochemiczne: aktywność ALT (IU/L), AST (IU/L), GGTP (IU/L), stężenie bilirubiny całkowitej (mg/dL), IgG (g/L) i γ -globulin (%),
- dane demograficzne: płeć, wiek (lata), BMI (kg/m^2),
- czas od rozpoznania do momentu wykonania MRCP+ (czas trwania choroby w latach).
- ocenę histopatologiczną biopsji wątroby.

Badania MRCP wykonano w IPCZD z użyciem skanera 1,5T Avanto^{fit} (Siemens Healthineers, Niemcy). Wykorzystano oprogramowanie do przetwarzania końcowego MRCP+TM (Perspectum Ltd., Wielka Brytania).

Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej przy użyciu programów SAS 9.4 Statistical Software (SAS Institute, Cary, North Carolina), R v.3.5.3 (R Core Team, Wiedeń, Austria) oraz Statistica v.13.3 (StatSoft Polska, Kraków) przyjmując za istotne statystycznie wyniki na poziomie istotności $p < 0,05$.

Wyniki badań przedstawiono na 32 stronach maszynopisu, posługując się 14 tabelami i 13 rycinami. Prezentacja graficzna okazała się niezbędna dla przejrzystego przedstawienia uzyskanych wyników. Analiza wyników przeprowadzonych badań wykazała, że stężenia GDF15, CK18, pro-C3, HA, LN były istotnie statystycznie wyższe w grupie dzieci z AIH i ASC w porównaniu do grupy kontrolnej (odpowiednio: 594 vs. 138 ng/mL; 35 vs. 11 ng/mL; 30 vs. 9 ng/mL; 113 vs. 47ng/mL; 439 vs. 78 ng/mL; $p < 0.001$ dla wszystkich parametrów) (tab.6) Analiza korelacji markerów surowiczych z parametrami histopatologicznymi wykazała w grupie chorych z AIH i ASC pojedynczą korelację stężenia GDF15 ze stopniem zapalenia wg Battsa i Ludwiga ($R=0.29$, $p=0.019$). Nie znaleziono

istotnych statystycznie korelacji stężenia CK18, HA, pro-C3 i LN ze stopniem włóknienia, zapalenia, ani stłuszczenia. Aktywność ALT i AST korelowała istotnie z włóknieniem wg Ishaka (odpowiednio $R=0.38$ $p=0.001$, $R=0.42$ $p=0.0003$); ze stopniem G i S wg Batts-Ludwiga (odpowiednio $R=0.59$ $p<0.0001$, $R=0.26$ $p=0.03$ i $R=0.35$ $p=0.004$, $R=0.26$ $p=0.03$); zapaleniem zrazikowym ($R=0.38$ $p=0.001$, $R=0.34$ $p=0.0005$) oraz zapaleniem wrotnym ($R=0.38$ $p=0.001$, $R=0.33$ $p=0.005$).

Wykazano istotne korelacje FIB-4 z włóknieniem wg Ishaka ($R=0.39$ $p=0.0009$), oraz stopniem G i S wg Batts i Ludwiga (odpowiednio: $R=0.26$ $p=0.03$, $R=0,25$ $p=0.04$) oraz a nalogiczne korelacje dla APRI (odpowiednio: $R=0.48$ $p<0.0001$; $R=0.41$ $p=0.0005$; $R=0.28$ $p=0.02$) (tab.7).

Żaden z ocenianych parametrów surowiczych i wyliczanych nie korelował ze stłuszczeniem w podgrupie z AIH i ASC.

Analiza ROC dla ocenianych markerów w grupie chorych z AIH i ASC wykazała, że GDF15 cechowało się największym polem pod krzywą ROC ($AUC=0.65$, $p=0.03$) w predykcji włóknienia st. 2-4 wg Batts-Ludwiga, LN była markerem o najwyższym $AUC=0.63$ ($p=0.03$) w predykcji zapalenia wrotnego st. 2-3, a dla GDF15 i HA wyznaczono największe pole pod krzywą w predykcji zapalenia zrazikowego dużego stopnia (dla obu markerów $AUC=0.65$, odpowiednio: $p=0.03$ i 0.02) (tab. 8).

Analiza ROC dla aktywności ALT, AST oraz parametrów wyliczanych (APRI i FIB-4) wykazała największą wartość AUC w predykcji włóknienia o dużym nasileniu (≥ 4 wg Ishaka) dla APRI ($AUC=0.7$), w predykcji nasilonego zapalenia zrazikowego AUC dla ALT wynosiło 0.77 , dla AST 0.8 , dla APRI 0.78 , a dla FIB-4 0.75 (tab. 9).

W badaniu nr 2 oceniano przydatność mpMRI w ocenie uszkodzenia wątroby. Stwierdzono istotne statystycznie zależności pomiędzy cT1 a parametrami histologicznymi. Wykazano dodatnie korelacje między cT1 a: włóknieniem ($R=0.38$, $P=0.001$); zapaleniem wrotnym i zrazikowym (odpowiednio $R=0.35$, $P=0.008$ i $R=0.32$, $P=0.016$) oraz martwicą ($R=0.43$, $P=0.002$) u pacjentów z grupy badanej obserwowano wyższe wartości cT1 i IQR (mediana cT1 876 ms, mediana IQR 115 ms) w porównaniu do grupy kontrolnej (mediana cT1 714 ms, mediana IQR 93 ms; ryc. 14).

Oceniając cT1 jako parametr monitorowania dynamiki zapalenia i włóknienia wątroby w trakcie leczenia wykazano, że podczas oceny w ramach follow-up u 9 z 29 pacjentów (31%) wystąpiły podwyższone wartości cT1 w porównaniu zarówno z grupą kontrolną ($P<0.0001$), jak i pozostałymi pacjentami z grupy AIH ($p<0.0001$), co korespondowało z potwierdzoną histopatologicznie wyższą aktywnością zapalną i stopniem włóknienia.

W badaniu nr 3 oceniającym przydatność MRCP+ w ocenie uszkodzenia wątroby wykazano w analizie AUROC, że 11 z 19 parametrów ilościowych uzyskanych w MRCP+ dobrze różnicowało chorych z AIH i ASC (AUC > 0.7). Parametrami o najwyższej zdolności do różnicowania były:

- liczba przewodów ze zwężeniami/rozszerzeniami (AUC: 0.81, 95% CI 0.65–0.96),
- liczba przewodów z poszerzeniami (AUC: 0.79, 95% CI 0.64–0.94),
- całkowita liczba przewodów (AUC: 0.79, 95% CI 0.63–0.95),
- liczba przewodów ze zwężeniami (AUC: 0.78, 95% CI 0.61–0.95) (tab. 17).

Dyskusja obejmująca 8 stron maszynopisu zawiera prawidłową interpretację wyników badań własnych na tle trafnie dobranego, głównie anglojęzycznego piśmiennictwa liczącego 148 pozycji. Doktorant szeroko uzasadnia wybór badanych markerów oraz metod obrazowych a następnie rzeczowo i profesjonalnie komentuje wyniki badań własnych w kontekście danych z piśmiennictwa. Należy w tym miejscu zaznaczyć, że w przeprowadzonym badaniu po raz pierwszy podjęto próbę oceny markerów surowiczych (CK18, GDF15, pro-C3, HA, LN) oraz parametrów wyliczanych (APRI i FIB-4) u dzieci z autoimmunizacyjnymi chorobami wątroby.

Analiza AUROC wskazała na potencjalną przydatność pojedynczych markerów w ocenie uszkodzenia wątroby i predykcji włóknienia, zapalenia wrotnego i zrazikowego ≥ 2 st. u chorych z AIH i ASC. Na podstawie przeprowadzonych badań wykazano, że ALT i AST oraz APRI i FIB-4 wydają się być parametrami czulszymi w wykrywaniu dużych zmian histopatologicznych (włóknienia i zapalenia zrazikowego) u dzieci z AIH i ASC w porównaniu do pozostałych ocenianych nowych markerów surowiczych. Mimo potwierdzonych zależności poszczególnych serologicznych markerów ze stopniem nasilenia zmian histologicznych, ich przydatność mierzona czułością i swoistością wydaje się ograniczona w praktyce klinicznej.

Doktorant bardzo dojrzałe wskazuje na ograniczenie badania jakim była mała liczebność grupy badanej, zwłaszcza podgrupy z ASC. Zwraca uwagę, że analizę wykonano dla jednego punktu czasowego, a poznanie potencjalnej dynamiki stężenia badanych markerów w odniesieniu do dynamiki zmian histopatologicznych mogłoby zwiększyć przydatność kliniczną ocenianych markerów u chorych z AIH i ASC.

Badanie nr 2 było pierwszym oceniającym metodę mpMRI u dzieci i wykazało możliwość wykorzystania tej techniki w nieinwazyjnej ocenie podstawowej aktywności autoimmunizacyjnej choroby wątroby u dzieci. Wyniki wskazały na związek między cT1 a wybranymi cechami histologicznymi choroby (zapalenie wrotne i zrazikowe). Wykazano,

że cT1 można wykorzystać jako dodatkowy biomarker do oceny aktywności choroby i uszkodzenia wątroby przydatny w monitorowaniu leczenia. Badanie zidentyfikowało mpMRI jako potencjalne narzędzie do nieinwazyjnego monitorowania AIH i uzasadnia przyszłe prospektywne badania kliniczne w celu pełnego zbadania użyteczności tej metody w praktyce klinicznej. Równoczesowa ocena niejednorodnego charakteru zmian w wątrobie za pomocą cT1 IQR pozwoliła na całkowite zróżnicowanie zdrowej kohorty od chorych w grupie badanej. Podkreśla to użyteczność mpMRI w dostarczaniu dodatkowych danych wspomagających diagnostykę i monitorowanie AIH.

Doktorant zwraca uwagę, że chociaż opisane powyżej wyniki są obiecujące, istnieją pewne ograniczenia przeprowadzonych analiz i wnioskowania. Ocenę kontrolną wykonano u niewielkiej liczby pacjentów, a średni czas obserwacji wynosił średnio 16,2 miesiąca, dlatego w celu dalszej walidacji wyników konieczne są wieloośrodkowe badania kontrolne przeprowadzone na grupie badanej o większej liczebności.

Badanie nr 3 pokazało, że, metoda ilościowego obrazowania dróg żółciowych MRCP+ dostarcza licznych danych ilościowych, które można wykorzystać do oceny drzewa żółciowego oraz które mogą skutecznie uwydatnić różnice między pacjentami z ASC a pacjentami z AIH. Łącząc dane ilościowe MRCP+, które precyzują względne nasilenie zarówno zwężeń, jak i poszerzeń (charakterystycznych dla SC) z całkowitą liczbą poszerzeń w drogach żółciowych, osiągnięto korzystny model różnicujący chorych z ASC i AIH. Dalsze rozwijanie metody MRCP+ może stanowić istotne wsparcie technik radiologicznych w diagnostyce i monitorowaniu autoimmunizacyjnych chorób wątroby u dzieci.

Wnioski sformułowane w trzech punktach odpowiadają celom pracy i przeprowadzonym analizom.

Z obowiązku recenzenta pozwolę sobie zwrócić uwagę, iż praca zawiera pewne drobne uchybienia np.:

- używanie terminu ALT, AST zamiast stężenie/aktywność ALT/AST
- używanie terminu adolescenci zamiast nastolatki/nastolatkowie
- zdublowana treść w tab 3 wersy 4 i 5 str 42

Nasuwa się także pytanie o możliwość wykorzystania elastografii wątroby, w kontekście ewentualnego wykorzystania zamiast biopsji wątroby, co nie było oczywiście przedmiotem badań w tej pracy.

Powyższe uwagi mają wyłącznie znaczenie porządkowe i w żaden sposób nie umniejszają wartości pracy, którą uważam za doskonałe, oryginalne, pionierskie opracowanie dotyczące analizy wybranych markerów surowiczych, wyliczanych oraz metod mpMRI i MRCP+ w ocenie uszkodzenia wątroby i monitorowania postępu choroby u dzieci

z autoimmunizacyjnymi chorobami wątroby, które potwierdza wysoką umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej przez Doktoranta.

Reasumując, praca spełnia warunki rozprawy doktorskiej zgodnie z art.13 ustawy z dnia 14 marca 2003r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki oraz par.6. Rozporządzenia Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 19 stycznia 2018r., stąd mam zaszczyt przedłożyć Wysokiej Radzie Naukowej Instytutu „Pomnik-Centrum Zdrowia Dziecka” w Warszawie wniosek o dopuszczenie lek.Kamila Janowskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie zwracam się do Wysokiej Rady Naukowej Instytutu „Pomnik-Centrum Zdrowia Dziecka” w Warszawie z wnioskiem o wyróżnienie rozprawy doktorskiej lek.med. Kamila Janowskiego.

KIEROWNIK
Katedry Chorób Zakaźnych i Hepatologii


prof. dr hab. Małgorzata Paulowska