



UNIwersytet Medyczny IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH WE WROCLAWIU

Wydział Farmaceutyczny

Katedra Analityki Medycznej

dr hab. Iwona Bil-Lula, prof. UMW

Wrocław, 20.07.2022

Recenzja rozprawy doktorskiej Pani Dagmary Przekop pt.: „Nieinwazyjne testy w diagnostyce włóknienia w przebiegu przewlekłego wirusowego zapalenia wątroby typu C oraz uszkodzenia wątroby w zakażeniu SARS-CoV-2”, w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu, w dyscyplinie nauki medyczne.

Promotor- prof. dr hab. Lech Chrostek

Zakład Diagnostyki Biochemicznej

Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

Przewlekłe zakażenie wirusem zapalenia wątroby typu C (HCV) jest problemem zdrowotnym o zasięgu globalnym. Dotyczy ono bowiem 58 mln ludzi na świecie (WHO, 2019r.) i jest wiodącą przyczyną przewlekłych chorób wątroby. Długotrwała choroba charakteryzuje się zmianami martwiczo-zapalnymi wątroby. HCV jest przenoszona na skutek skażenia różnego rodzaju przyrządów medycznych i niemedycznych, które naruszają ciągłość skóry. Aż 60–90% wszystkich zarejestrowanych zakażeń jest związanych z pobytem w szpitalu lub leczeniem ambulatoryjnym. Obecnie ryzyko zakażenia na skutek przetoczenia krwi lub jej pochodnych jest minimalne w związku z rygorystycznym, bardzo skutecznym systemem kontroli tych produktów i wynosi ono w krajach rozwiniętych 1:200 000 lub poniżej. Przewlekłe wirusowe zapalenie wątroby typu C rozwija się przez wiele lat bezobjawowo lub wywołuje objawy niespecyficzne, w postaci zmęczenia, apatii, senności, co niewątpliwie opóźnia diagnozę. Przewlekłe zakażenie powoduje wieloletni proces zapalny, martwicę i regenerację hepatocytów. W okresie ok. 20 lat od początku choroby u ok. 20% pacjentów rozwija się marskość wątroby. Z kolei ryzyko rozwoju raka wątrobowokomórkowego (HCC) w marskiej wątrobie wynosi rocznie ok. 1–4%. Niestety z uwagi na niespecyficzne objawy, duża część osób chorujących na przewlekłe WZW-C jest nieświadoma zakażenia. Niemniej eliminacja wirusa HCV, nawet w późnym okresie choroby, stwarza perspektywę regresji włóknienia wątrobowego oraz zmniejszenia ryzyka rozwoju HCC.

W ostatnich latach wprowadzono innowacyjne zmiany w metodach leczenia przewlekłego wirusowego zapalenia wątroby typu C. Nowe doustne leki o bezpośrednim działaniu na wirusa wykazują przeciwwirusowe działanie wobec wszystkich genotypów HCV i osiągają ponad 90% skuteczność w eradykacji wirusa. Dodatkowo, nowe terapie trwają odpowiednio krócej (8–12 tygodni), wywołując przy tym znacznie mniej działań niepożądanych. Wprowadzenie przez Europejską Agencję Leków bezinterferonowego schematu leczenia doprowadziło do wytworzenia trwałej odpowiedzi wirusologicznej.

Skuteczna terapia przewlekłego wirusowego zapalenia wątroby typu C jest jednak możliwa jedynie w przypadku potwierdzenia zakażenia wirusem, stąd niezwykle ważnym elementem opieki nad pacjentem zakażonym HCV jest skuteczna diagnostyka, a następnie monitorowanie przebiegu choroby. Badania diagnostyczne obejmują analizę przeciwciał anti-HCV oraz wykrycie materiału genetycznego wirusa w organizmie. Badaniami pomocniczymi są m.in.: ocena aktywności aminotransferaz, nieinwazyjna ocena włóknienia wątroby przy pomocy elastografii oraz badanie morfologiczne wątroby, wskazane w przypadku podejrzenia innej, współistniejącej choroby wątroby lub niezgodności wyniku badania nieinwazyjnego z obrazem klinicznym chorego. Dlatego też diagnostyka chorób wątroby nadal stanowi wyzwanie.

Coraz większym zainteresowaniem w rutynowej praktyce klinicznej cieszą się tzw. nieinwazyjne wskaźniki funkcji wątroby, zgodnie z algorytmem HEPAScore, Fibrotest oraz nieopatentowane jeszcze panele laboratoryjne oparte m.in. na enzymach wątrobowych, cholesterolu całkowitym, bilirubinie, albuminie, parametrach hematologicznych, wieku pacjenta oraz wskaźnikach antropometrycznych. Podobne parametry znalazły zastosowanie w ocenie uszkodzeń wątroby w przebiegu zakażenia wirusem Sars-CoV-2. Jak wynika z dotychczasowej literatury, jest to wirus o działaniu plejotropowym, a głównymi powikłaniami zakażenia są: choroby płuc, zaburzenia ze strony nerek, serca, układu nerwowego oraz wątroby, kończący się na ciężkiej niewydolności oddechowej, niewydolności wielonarządowej. Patomechanizm uszkodzenia wątroby w przebiegu zakażenia Sars-CoV-2 jest bardzo złożony i, jak dotychczas, wiedza na ten temat pozostaje niewyczerpana. Biorąc zatem pod uwagę poważne skutki tej choroby, istnieje potrzeba poszukiwania nowych, wiarygodnych markerów służących do diagnostyki, monitorowania i ewentualnego prognozowania m.in. wątrobowych skutków zakażenia wirusem.

Z uwagi na powyższe, cel i założenia, przedłożonej do recenzji rozprawy doktorskiej, są niezwykle istotne i wpisują się w ogólnoswiatowe trendy naukowe i kliniczne.

Przedstawiona do oceny dysertacja jest opracowaniem na podstawie cyklu 2 publikacji: 1 przeglądowej i 1 oryginalnej. W mojej ocenie, układ pracy jest przejrzysty i zgodny z wymaganiami stawianymi rozprawom doktorskim.

Dysertację rozpoczyna spis treści, wykaz publikacji stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej oraz wykaz skrótów. Właściwą treść rozprawy rozpoczyna zwięzłe wprowadzenie, które w sposób syntetyczny i kompleksowy omawia zagadnienia związane z tematem rozprawy doktorskiej. Doktorantka omówiła obecny stan wiedzy na temat wirusowego zapalenia wątroby typu C, jego charakterystykę kliniczną i protokoły leczenia. Ponadto, we wprowadzeniu, omówiono metody oceny włóknienia wątroby oraz wskazano na zalety i wady rutynowo stosowanych metod diagnostycznych, co stanowi o dużej dojrzałości naukowej Doktorantki.

Głównym założeniem i celem rozprawy doktorskiej Pani Dagmary Przekop była ocena przydatności nieinwazyjnych, laboratoryjnych wskaźników włóknienia wątroby w ocenie skuteczności bezinterferonowego leczenia przewlekłego zapalenia wątroby typu C, według schematu VDR. Dalsze cele zakładały porównanie mocy diagnostycznej nieinwazyjnych wskaźników włóknienia wątroby oraz inwazyjnej biopsji wątroby oraz porównanie skuteczności terapii bezinterferonowej według schematu VDR w grupie leczonej nieskutecznie przy pomocy interferonu i rybawiryny oraz w grupie uprzednio nieleczonej. Kolejnym celem było wykazanie przydatności testów oceniających funkcje wątroby u chorych z uszkodzeniem wątroby w przebiegu COVID-19. Według mojej oceny cele pracy zostały sformułowane poprawnie, opisane rzeczowo i zrozumiale, a sam pomysł Autorki, dotyczący analizy nieinwazyjnych laboratoryjnych wskaźników włóknienia wątroby uważam za bardzo interesujący i niezwykle istotny w praktyce klinicznej.

W rozdziale „Realizacja celów naukowych”, Doktorantka przedstawia grupę badaną, materiał do badań oraz wyniki badań, omówienie wyników, dyskusję i wnioski. Autorka przeprowadziła badanie w grupie 70 pacjentów z wirusowym zapaleniem wątroby typu C, leczonych według schematu Viekirax+Dezabuwir+Rybawiryna. Dodatkowo, pacjentów podzielono na grupę nieskutecznie leczoną uprzednio pegylowanym interferonem alfa i rybawiryną oraz grupę nieleczonej. Niestety w tej części nie znaleziono informacji na temat zastosowanych metod laboratoryjnych, ani metod statystycznych, aczkolwiek informacje te można odszukać w publikacji oryginalnej, stanowiącej podstawę do przygotowania rozprawy doktorskiej.

W podrozdziale „Wyniki” Doktorantka przedstawiła opis oceny stopnia zwłóknienia wątroby, określenie nieinwazyjnych wskaźników zwłóknienia wątroby, analizę literatury pod względem oceny stopnia uszkodzenia wątroby w przebiegu COVID-19 oraz metody statystyczne. Opisy te stanowią sposób oceny histopatologicznej bioptatów oraz elastografię, jako nieinwazyjną metodę oceny sprężystości tkanki. W mojej opinii, metody te powinny zostać opisane w części poświęconej metodom, ponieważ nie stanowią wyników badań, a jedynie opis sposobu ich wykonania. Podobnie, w podpunkcie 5.2.2. rozdziału „Wyniki” Autorka opisuje metody laboratoryjne oceny liczby płytek krwi, aktywności AST, ALT, GGT oraz stężenia bilirubiny, cholesterolu i albuminy, oraz metodę oceny wirerii HCV, które powinny znajdować się w rozdziale „Metody”, a nie „Wyniki”. Z uwagi jednak na kolejny podrozdział „Omówienie wyników”, wnioskuję, iż powyższe jest wynikiem jedynie omyłki pisarskiej, gdzie zamiast podrozdziału „Metody” pojawił się podrozdział „Wyniki”.

W podrozdziale „Omówienie wyników” Pani Przekop w sposób umiejętny i uporządkowany omówiła uzyskane wyniki. Doktorantka udowodniła istotnie wyższą sztywność wątroby, ocenioną metodą Fibroscan, na początku terapii PEG INF+RBV, w porównaniu do okresu po zakończeniu leczenia. Wykazała również, iż zastosowane leczenie wstępne nie miało wpływu na sztywność wątroby po 12 tygodniach terapii, w porównaniu do grupy nieleczonej. Dodatkowo, 12 tygodniowe stosowanie Viekirax+Dezabuwir+Ribawiryna doprowadziło do zmniejszenia częstości wyników wskazujących na zwłóknienie lub marskość wątroby, z 21,4% do 11,4% oraz do zmniejszenia wirerii do poziomu niewykrywalnego. Analiza biochemiczna wykazała istotny spadek AST, ALT i GGT po dwunastu tygodniach leczenia VDR, zarówno w grupie wcześniej poddanej leczeniu PEG INF+RBV oraz w grupie uprzednio nieleczonej. Co ciekawe, zastosowana terapia miała również wpływ na wzrost liczby płytek krwi u pacjentów nieleczonych PEG INF+RBV oraz wzrost stężenia albuminy po 12 tygodniach stosowania VDR. Z kolei terapia VDR nie miała wpływu na stężenie bilirubiny oraz cholesterolu w obu grupach. Analiza powszechnie stosowanych nieinwazyjnych biomarkerów zwłóknienia wątroby potwierdziła wyniki uzyskane metodą elastografii. Zastosowana terapia VDR istotnie obniżyła wskaźniki APRI i GAPRI, niezależnie od leczenia wstępnego. Podobnie zaobserwowano znaczące obniżenie wskaźnika FIB-4 i RORNS w obu grupach oraz AP w grupie wstępnie nieleczonej i HUI w grupie wstępnie leczonej. Ponadto, niezwykle istotne było wykazanie wysokiej korelacji wszystkich nieinwazyjnych biomarkerów zwłóknienia wątroby z wynikami elastografii przed wdrożeniem leczenia. W części poświęconej analizie korelacji, Autorka stwierdziła, iż wszystkie korelacje, poza GAPRI, po 12 tygodniach leczenia, były słabsze ($R < 0,4$), przy czym, w pracy oryginalnej pt.: *Non-invasive indirect markers of liver fibrosis after*

interferon-free treatment for hepatitis C, możemy znaleźć informację, iż wszystkie korelacje oscylowały w granicach $R=0,561-0,701$, co wg programu Statistica odnosi się do korelacji wysokiej. Niezwykle ważnym klinicznie osiągnięciem było, w mojej opinii, wykazanie wysokiej mocy diagnostycznej nieinwazyjnych biomarkerów włóknienia wątroby ($AUC > 0,8$) zarówno dla różnicowania istotnego i nieistotnego włóknienia oraz różnicowania włóknienia i marskości, niezależnie od czasu, pomimo mniejszej mocy diagnostycznej w porównaniu do wyników uzyskanych za pomocą metody elastografii i biopsji wątroby.

W ostatniej części pracy Autorka umiejętnie przeanalizowała doniesienia literaturowe na temat zaburzeń funkcji wątroby w przebiegu COVID-19. Przeanalizowano zmiany biochemicznych parametrów wątrobowych, wyników morfologii, stężenia ferrytyny, i aktywności kinazy kreatynowej. Wykazano także wpływ leczenia przeciwwirusowego na ciężkość uszkodzenia wątroby i zauważono potrzebę monitorowania parametrów wątrobowych u tych chorych. Cenną informacją było wykazanie wyższego ryzyka ciężkiego uszkodzenia wątroby u mężczyzn, u osób z obniżoną liczbą limfocytów oraz zwiększoną liczbą neutrofilów.

Uzyskane wyniki badań Autorka umiejętnie skomentowała i przedyskutowała wobec dotychczasowych doniesień literaturowych. W swojej dysertacji Doktorantka udowodniła, iż 12 tygodniowe leczenie Viekirax+Dezabuwir+Rybawiryna doprowadziło do skutecznej eradykacji wirusa HCV, niemniej jednak istnieje potrzeba kontynuowania terapii celem uzyskania całkowitej regresji włóknienia. W swojej dysertacji Pani Przekop przedyskutowała wady i zalety biopsji i elastografii oraz wskazała na przydatność rozszerzenia diagnostyki o ocenę nieinwazyjnych wskaźników włóknienia wątroby. Na podkreślenie zasługuje krytyczna postawa Doktorantki w stosunku do uzyskanych wyników. Autorka trafnie zdyskwalifikowała wskaźniki APRI i GAPRI, jako predyktory istotnego włóknienia. Skrytykowała także ich niższą moc diagnostyczną w porównaniu do biopsji i elastografii. Bardzo trafnym był komentarz dotyczący wpływu stanu zapalnego na zmiany wartości biomarkerów podczas leczenia.

Ocena zmian parametrów wątrobowych w przebiegu zakażenia Sars-CoV-2, na podstawie dostępnej literatury, w obliczu trwającej pandemii światowej, niewątpliwie zasługuje na uznanie. Wnikliwa analiza przybliży czytelnika do poznania złożonego patomechanizmu uszkodzenia wątroby w przebiegu COVID-19, wskazując m.in. na drogę receptorową, dysregulację wrodzonej odpowiedzi immunologicznej czy toksyczny wpływ leków przeciwwirusowych, włączając lopinawirem i rytonawirem, stosowane w leczeniu COVID-19. Bardzo istotnym odkryciem było udokumentowanie zależności pomiędzy stopniem ciężkości uszkodzenia wątroby a wartościami testów funkcji wątroby, co może się istotnie przełożyć na implikacje kliniczne.

Na podstawie przeprowadzonych badań i dyskusji Doktorantka wyciągnęła 6, poprawnie sformułowanych, wniosków. Wnioski logicznie wynikają z uzyskanych wyników i odpowiadają postawionym przez Doktorantkę celom. Główna konkluzja wskazuje na konieczność kontynuowania terapii VDR, pomimo eradykacji wirusa, z uwagi na niecałkowitą regresję włóknienia. Bardzo interesującym wnioskiem, który wnosi nowe spojrzenie na diagnostykę włóknienia wątroby, jest udokumentowanie, iż wartości nieinwazyjnych wskaźników włóknienia wątroby są uzależnione od stopnia zaawansowania choroby przed wprowadzeniem terapii VDR, ale także od wdrożenia leczenia wstępnego PEG INF+RBV. Ponadto wykazano, iż pacjenci z współistniejącymi chorobami wątroby pozostają w grupie wyższego ryzyka ciężkiego przebiegu COVID-19.

Pracę kończy spis literatury, w którym odniesiono się do 80 pozycji literaturowych, wyłącznie obcojęzycznych, co świadczy o rzetelnym studium literatury światowej. Publikacje stanowią doniesienia z lat 1995-2022, z czego ponad 61% stanowiły prace z ostatnich 5-lat.

W rozdziałach 8-9 zamieszczono streszczenia w języku polskim i angielskim, w których Autorka w sposób klarowny i zrozumiały przedstawiła założenia, metodykę oraz uzyskane wyniki.

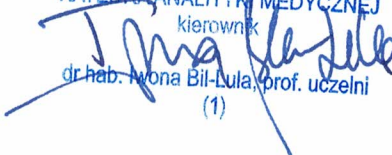
Według mojej opinii, wyniki przeprowadzonych przez Doktorantkę badań są niezwykle interesujące, mają wysoki potencjał implikacyjny i mogą stanowić preludium do dalszych badań w tym zakresie. Z pełnym przekonaniem mogę stwierdzić, iż powyższe wyniki mogą okazać się w przyszłości cennymi danymi do opracowania nowych algorytmów diagnozowania i monitorowania chorych ze zwłóknieniem wątroby w przebiegu różnych chorób.

Z obowiązku jako Recenzenta przedłożonej rozprawy doktorskiej chciałabym przedłożyć pojedyncze sugestie, które mogą prowadzić do udoskonalenia rozprawy przed złożeniem jest w repozytorium biblioteki Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku. Nie udało się Doktorance uniknąć pojedynczych błędów interpunkcyjnych (str. 8, 16, 31, 46), błędów składniowych i edytorskich (str. 26: "przemawia ze tym wysoka korelacja z wynikami biopsji, przydatnych w"; str. 31: „...wysoki wartości enzymów...; str. 32: „Zamiana modelu terapeutycznego z lopinawiru/rytonawiru na remdesiwir powodowało...”). Ponadto, nie uniknięto uchybień w postaci sformułowań potocznych typu: „na starcie eksperymentu” (str. 18) czy „poziom bilirubiny” (str. 32) zamiast „stężenie bilirubiny”. Pragnę jednak stanowczo podkreślić, iż wskazane przeze mnie niedociągnięcia nie ujmują, w żaden sposób, merytorycznej jakości rozprawy doktorskiej, którą oceniam bardzo wysoko.

Podsumowując uważam, iż przedłożona do recenzji dysertacja jest przemyślana oraz dobrze zaprojektowaną pracą i zawiera wszystkie wymagane elementy rozprawy doktorskiej.

Wyniki badań przedstawiono w sposób logiczny, rzetelny, przejrzysty i konsekwentny, co potwierdza umiejętność Doktorantki samodzielnego projektowania i prowadzenia prac badawczych. Potwierdzony przez współautorów, wysoki wkład Autorki w powstanie artykułów, stanowiących cykl prac, (55 i 60%) świadczy o dużym wysiłku Doktorantki, podczas przygotowywania rozprawy. **W związku z powyższym wnioskuję o uznanie dysertacji za wyróżniającą się.**

Stwierdzam zatem, że rozprawa Pani Dagmary Przekop pt.: „Nieinwazyjne testy w diagnostyce włóknienia w przebiegu przewlekłego wirusowego zapalenia wątroby typu C oraz uszkodzenia wątroby w zakażeniu SARS-CoV-2” stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego i spełnia wszystkie wymogi zwyczajowe i ustawowe, stawiane rozprawom doktorskim w postępowaniu o nadanie stopnia doktora nauk medycznych, określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2022r., poz. 574). W związku z powyższym wnoszę do Wysokiego Senatu Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku wniosek o dopuszczenie Pani Dagmary Przekop do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora oraz o wyróżnienie rozprawy doktorskiej.

Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu
KATEDRA ANALITYKI MEDYCZNEJ
kierownik

dr hab. Wrona Bil-Lula, prof. uczelni
(1)

