

UNIWERSYTET MEDYCZNY W BIAŁYMSTOKU

**I KLINIKA NEFROLOGII I
TRANSPLANTOLOGII Z OŚRODKIEM DIALIZ**

15-540 Białystok ul. Żurawia 14, tel.: (085) 7409458, fax: (085) 7434586, e-mail: bnaumnik@poczta.onet.pl

Białystok, 21.07.2017

Opinia
o dysertacji doktorskiej pt.
**Wybrane białka surowicy i moczu jako biomarkery aktywności choroby w
układowym zapaleniu naczyń związanym z przeciwciałami przeciw cytoplazmie
neutrofilów**

autorstwa lek. med. Olumide Olatubosun Rowaiye
praca wykonana pod kierunkiem dr hab. med. Mariusza Kuzstala

Problem diagnostyki i terapii układowego zapalenia naczyń (*vasculitis*) jest nie tylko nadal aktualny ale również trudny do rozwiązania. Mimo, że choroba należy do kręgu tzw. schorzeń rzadkich, to w praktyce klinicznej, a szczególnie w ośrodkach wysokospecjalistycznych, jest wyraźnie obecna i nierzadko ma fatalny przebieg. Rokowanie, pomimo nowych opcji terapeutycznych i opracowanych schematów postępowania, nie jest dobre. Ocena jej aktywności, wobec braku stosownych biomarkerów, zawsze była i jest dużym wyzwaniem.

Schorzenia z grupy *vasculitis* to obszerny rozdział w medycynie. Są to zazwyczaj wieloukładowe choroby o etiologii autoimmunologicznej, o niejasnej patogenezie, dotyczące naczyń różnego kalibru. Jedną z jej form, zajmującą drobne i średnie naczynia, jest układowe zapalenie naczyń związane z przeciwciałami przeciwko cytoplazmie neutrofilów (ANCA), ang. AAV (*ANCA-associated vasculitis*).

Przeciwciała przeciwko endotelinie-1 typu A (anty-ETAR) oraz rozpuszczalny receptor dla urokinazowego aktywatora plazminogenu (suPAR), to białka będące biomarkerami m.in. uszkodzenia naczyń i waskulopatii związanych ze stanem zapalnym. Istnieją doniesienia o roli suPAR jako wskaźnika prognostycznego w różnych populacjach pacjentów cierpiących na schorzenia zapalne. Stąd wynika próba ustalenia przydatności oznaczania przeciwciał anty-

ETAR w surowicy oraz suPAR w osoczu i moczu jako biomarkerów aktywności choroby u pacjentów z AAV. Tak więc przedmiot podjętych przez Doktoranta badań jest ciekawy i uzasadniony - zarówno z uwagi na aspekty poznawcze, jak i codzienną praktykę kliniczną.

Monografia wraz z piśmiennictwem liczy 132 strony druku. Posiada typowy dla dysertacji doktorskich układ. Obszerny wstęp poprzedzony jest spisem treści i indeksem skrótów.

We *Wstępie* Autor przybliżył definicję, epidemiologię, kryteria rozpoznania i obraz kliniczny waskulitów związanych z przeciwciałami ANCA (*anti-neutrophil cytoplasmic antibody*, przeciwciała przeciwko cytoplazmie neutrofilów) wyróżniając, zgodnie z obowiązującym konsensusem z Chapel Hill z 2012r., ziarniniakowatość z zapaleniem naczyń (GPA), eozynofilową postacią GPA (EGPA) i mikroskopowe zapalenie naczyń (MPA). Następnie wyczerpująco przedstawia charakterystykę, rolę w patogenezie AAV, częstość występowania i specyfikę oznaczania przeciwciał ANCA. Bardzo słusznie podkreśla, że u części chorych, pomimo charakterystycznego obrazu klinicznego AAV, nie stwierdza się przeciwciał ANCA, stąd m.in. wynikają problemy zarówno w nomenklaturze jak i w klasyfikacji tej jednostki chorobowej. Z drugiej strony dodatni wynik tych przeciwciał może niespecyficznym pojawiać się w innych chorobach np. infekcyjnym zapaleniu wsierdza, zespole Goodpasture'a czy zapalnych chorobach jelit. Autor zwraca uwagę na uwarunkowania genetyczne i czynniki środowiskowe, infekcyjne i jatrogenne mające wpływ na rozwój AAV. Zgodnie z najnowszymi doniesieniami wymienia także inne rodzaje przeciwciał (przeciwko plazminogenowi, LAMP-2 czy przeciwko moezynie), które prawdopodobnie biorą udział w etiopatogenezie zapalnych waskulopatii. Przedstawia założenia diagnostyki i rozpoznania różnicowego AAV zwracając uwagę na brak jasnych kryteriów diagnostycznych i wynikające z tego utrudnienia. Autor podkreśla rolę biopsji tkankowej w rozpoznaniu AAV ze szczególnym zwróceniem uwagi na biopsję nerki i płuca. Biopsja nerki dostarcza również danych prognostycznych, jednak interpretacja zmian nie jest oczywista i wymaga stworzenia ujednoczonej klasyfikacji. Autor przedstawia aktualne skale oceny aktywności choroby stosowane w praktyce klinicznej tj. BVAS (*Birmingham Vasculitis Activity Score*), VDI (*Vasculitis Damage Index*) a także znaczenie monitorowania przeciwciał ANCA oraz wskaźników ostrej fazy (CRP, prokalcytonina). Doktorant zaznacza, że przeciwciała ANCA nie są uniwersalnym markerem i nie służą do monitorowania aktywności choroby. Obszerny rozdział *Wstępu* poświęcony jest biomarkerom będącym kandydatami do oceny aktywności AAV, wśród których uwagę Autora przyciągnęły

dwa – przeciwciała anti-ETAR i rozpuszczalny receptor suPAR. Ich struktura, rola i dowody naukowe na możliwość zastosowania zostały szeroko opisane. Wstęp zamykają wyczerpujące informacje na temat terapii AAV, rokowania i czynników ryzyka nawrotu choroby. Opis jest wyczerpujący, informatywny i stanowi dobrą podbudowę merytoryczną do przeprowadzonego badania. Jedynymi zastrzeżeniami w tym miejscu dysertacji jest brak wyjaśnienia niektórych skrótów np. RLV w *Tabeli 2* (str. 18) i nieprecyzyjne wyjaśnienie terminu „remisja choroby” (str. 43). Zgodnie z 6-ą pozycją piśmiennictwa, na którą Autor się powołuje, definicja ta zakłada dobrą kontrolę choroby przez ≥ 6 miesięcy dla wszystkich chorych (ważny jest więc czynnik czasu, o którym Doktorant w ogóle nie pisze) i w przypadku pacjentów pozostających na terapii doustnej ≤ 10 mg prednizolonu dziennie remisję określa $BVAS \leq 1$ (w więc nie = 0 w każdym przypadku, jak podaje Autor).

Podsumowując tę część pracy, *Wstęp* napisany jest zwięźle, logicznie i bardzo przystępnie. Jest dobrym wprowadzeniem czytelnika w pryncypia problematyki rozwiniętej w dalszej części.

Cele pracy, podane w sposób zwięzły, syntetyczny i logiczny, wypływają z rozważań zawartych we wstępie. Autor wytycza, jako główne zadanie, ocenę przydatności oznaczania w osoczu i moczu rozpuszczalnego receptora suPAR jako biomarkera aktywności układowego zapalenia naczyń związanego z ANCA. Wtórne cele to 1) oznaczenie przeciwciał anti-ETAR w surowicy pacjentów z AAV i sprawdzenie ich związku jako ewentualnego biomarkera z aktywnością/remisją choroby, 2) sprawdzenie związku pomiędzy suPAR i anti-ETAR a funkcją nerek, czynnikami demograficznymi (płeć, wiek), biochemicznymi (CRP) i serologicznymi (stężenie ANCA).

Materiał do prospektywnych badań obserwacyjnych (mediana okresu obserwacji 12 miesięcy) pozyskano od 60 chorych ze zdiagnozowanym (wykładniki kliniczne/potwierdzenie biopsyjne) układowym zapaleniem naczyń związanym z ANCA leczonych w Klinice Nefrologii i Medycyny Transplantacyjnej i jej przyklinicznym ambulatorium oraz Klinice Reumatologii i Chorób Wewnętrznych Uniwersyteckiego Szpitala we Wrocławiu. Grupę kontrolną stanowiło 21 zdrowych ochotników. Kryteria włączenia i wyłączenia są przejrzyste. Zastrzeżenia budzi jedynie zamieszczenie we wstępnej charakterystyce chorych (*Tabela 13* str. 49) wyników oznaczenia badanych biomarkerów, które powinny się znaleźć na początku *Wyników*.

Metody oznaczeń laboratoryjnych zostały poprawnie przedstawione. Nie do końca zrozumiałe jest jednak założenie podziału grupy badanej na podgrupy definiowane jako remisja i choroba aktywna. Powołując się na definicję remisji [6 pozycja piśmiennictwa] w podgrupie chorych na przewlekłej terapii steroidami (a tych w badanej populacji było 96.7% wg Tabeli 18) wydaje się, że BVAS powinien wynosić nie 0 ale ≤ 1 , a BVAS podgrupy z aktywną chorobą >1 (a nie ≥ 1). Niemniej jednak nie jest jasne czy „low dose” (niska dawka) steroidów była ≤ 10 mg u tych chorych i czy spełniała kryteria definicji zgodnie ze źródłem, na które powołuje się Autor. Należy to doprecyzować. Być może była wyższa i dlatego zaostrzono kryteria przynależności do poszczególnych grup. Nie jest znany również czas remisji, jaki był brany pod uwagę przy kategoryzacji grup. Odsyłanie czytającego na stronę internetową, gdzie po zalogowaniu się można uzyskać dostęp do szkolenia dotyczącego interpretacji skali BVAS jest w tej sytuacji niecelowe, ponieważ niczego nie precyzuje.

Metody badań zastosowane przez Doktoranta i techniki analizy laboratoryjnej są ogólnie przyjęte i w pełni poprawne. Metody statystyczne zastosowane w pracy są starannie dobrane i adekwatne zarówno do założeń jak i obranych technik. Jedynym zastrzeżeniem jest brak informacji o metodzie testowania rozkładu zmiennych liczbowych, które, sądząc po zastosowanych testach korelacji, były niejednorodne (rozkład normalny i/lub skośny).

Wyniki badań Autor przedstawił na 27 stronach w postaci opisowej oraz zilustrował je 30 tabelami i 8 rycinami. Zwraca uwagę bardzo ładna forma graficzna. Wyniki badań są bardzo ciekawe. Autor opisuje, że w surowicy pacjentów z aktywnym AAV (przyjęte BVAS ≥ 1) stwierdzono przeciwciała anti-ETAR w 43% przypadków (u 26 chorych), w tym u przeważającej większości (bo aż u 21) pacjentów z aktywnym AAV. U chorych z aktywnym AAV stwierdzono również wyższe stężenie suPAR w osoczu oraz wyższe wartości stosunku suPAR do kreatyniny w moczu w porównaniu z pacjentami w remisji (BVAS = 0). Osoczowe stężenie suPAR korelowało dodatnio z punktacją w skali BVAS, co potwierdza hipotezę wyjściową o rozważeniu tego białka jako potencjalnego markera aktywności AAV. Analiza krzywej ROC pozwoliła na ustalenie odcięcia dla stężenia suPAR w osoczu na poziomie 4.94 ng/ml jako wartości predykcyjnej aktywnej choroby (przy czułości 69%, swoistości 90% i PLR 6.9). Dla miana przeciwciał anti-ETAR w surowicy wartość ta wyniosła 3.35 U/ml (przy czułości 57%, swoistości 95% i PLR 11.4), a dla wartości stosunku suPAR do kreatyniny w moczu odpowiednio 7.442 ng/mg (przy czułości 48%, swoistości 96% i PLR 12). Stwierdzono

znamienną statystycznie ujemną korelację pomiędzy stężeniem suPAR w osoczu a szacowaną wielkością filtracji kłębuszkowej (eGFR) podczas gdy zarówno miano przeciwciał anti-ETAR w surowicy, jak i stosunek suPAR do kreatyniny w moczu takiej korelacji nie wykazywały. Nakazuje to zachowanie dużej ostrożności w interpretacji wyników stężenia osoczowego suPAR, gdyż spadek filtracji kłębuszkowej może wpływać na biodegradację tego białka i zawiązać jego pomiary. Miano przeciwciał ANCA, standardowo oznaczane w praktyce klinicznej, nie korelowało z aktywnością choroby. Korelację taką wykazano dla CRP.

W okresie obserwacji u 10 chorych (16.7% badanych) stwierdzono nawrót choroby (5 przypadków nawrotu o ciężkim i 5 o łagodnym przebiegu). Steżenia suPAR w osoczu były znamiennie wyższe w grupie z nawrotem. Co ciekawe, nawrotu nie obserwowano w żadnym przypadku wśród chorych hemodializowanych. Ponadto, w okresie obserwacji wystąpiło 5 zgonów (8.3%), z czego 20% było spowodowanych zaostrzeniem choroby podstawowej, 40% - infekcjami, 20% - chorobą nowotworową i 20% - miało inną przyczynę. We wszystkich przypadkach obserwowano wysokie wartości suPAR w osoczu na początku badania, zaakcentowano więc dodatkową użyteczność suPAR w osoczu jako niekorzystnego markera prognostycznego.

W przedstawieniu *Wyników* wdarła się jednak nieścisłość pod postacią rozbieżności ilościowej podgrup pacjentów w stosunku do podawanej liczebności grupy badanej. W *Opisie badanej populacji* i w *Streszczeniu* Autor podaje, że grupa chorych ze zdiagnozowanym AAV wynosiła 60 osób. W *Wynikach*, w podrozdziale 5.1 na str. 58 oraz w *Tabelach 19 i 20* podgrupa BVAS = 0 liczy 20 pacjentów, a podgrupa BVAS ≥ 1 liczy 50 chorych – łącznie 70 badanych. Przeliczając procentowo dane przedstawione w dalszych podrozdziałach wynika, że grupa badana liczyła 60 a nie 70 pacjentów stąd wnioskuję, że w wymienionym podrozdziale i Tabelach jest błąd.

Pragnę jednak podkreślić, iż wyniki badań uzyskane przez Doktoranta uważam za bardzo ciekawe i istotne w praktyce klinicznej.

Dyskusja, to dość krótki, ale niezwykle istotny i merytorycznie bardzo dobrze napisany rozdział monografii. Jest silną stroną dysertacji. Autor dyskutuje każdy aspekt stawianej przez siebie hipotezy. Na początku omawia cechy idealnego biomarkera, co stanowi dopełnienie wstępu i uzupełnia merytoryczną podbudowę pracy. Następnie dyskutuje, w opraciu o

piśmiennictwo, kliniczne podobieństwa i różnice stwierdzane pomiędzy badaną grupą chorych a aktualnie dostępną wiedzą praktyczną. W kolejnych paragrafach koncentruje się na badanych biomarkerach szeroko analizując uzyskane wyniki. Zwraca uwagę na pewien potencjał miana przeciwciał anti-ETAR w różnicowaniu aktywnej choroby AAV i jej remisji, podkreślając mankamenty tej hipotezy przełożone bezpośrednio na wcześniej opisane rezultaty. Natomiast podkreśla, szeroko argumentując, przydatność oznaczania osocznego suPAR w tym aspekcie. Potwierdza jednocześnie małą przydatność przeciwciał PR3-ANCA i dobrą korelację CRP z aktywnością choroby, co dokumentuje poprawność przeprowadzonego badania. Autor słusznie zwraca uwagę na znaczenia stężenia suPAR w osoczu w identyfikacji chorych ze zwiększonym ryzykiem nawrotu choroby a nawet zgonu. Doktorant przeprowadza szczegółową analizę przyczyn zgonów u pacjentów z AAV w różnych aspektach, m.in. w odniesieniu do rodzaju terapii immunosupresyjnej i jej dawek kumulacyjnych. Ta część monografii jest szczególnie ciekawa ponieważ porusza uciążliwe zagadnienie powikłań długoterminowego leczenia układowego zapalenia naczyń i jego skutków odległych.

Dla porządku jedynie dodam, iż podczas przygotowywania pracy do druku Doktorant powinien także skorygować błędne sformułowania jak np. zajęcie nerek zamiast „zajęcie nerkowe” czy stężenie w miejsce „poziomu” prokalcytoniny.

Doktorant, pod koniec *Dyskusji*, zamieścił podrozdział mówiący o ograniczeniach przeprowadzonego badania. Świadczy to o dużym obiektywizmie i świadomości zarówno watorów własnej pracy, jak i jej niedociągnięć. Bardzo słusznie Autor wypunktował: obserwacyjny charakter badania z dużą różnorodnością czasu trwania choroby, brak możliwości odniesienia wyników do pomiarów u chorych bez zajęcia nerek i ograniczenia metodologiczne u pacjentów ze schyłkową niewydolnością nerek.

Wnioski wynikające z przeprowadzonych badań zostały zawarte w 6 punktach. Najważniejszy z nich ma bezpośrednie odniesienie do praktyki lekarskiej i dotyczy możliwości zastosowania rozpuszczalnego receptora dla urokinazowego aktywatora plazminogenu w osoczu jako biomarkera aktywności AAV. Natomiast ze względu na jego bezpośrednią, odwrotną zależność od funkcji nerek, wniosek 4 powinien być podany jako drugi, ponieważ jest bardzo istotny i nakazuje ostrożność w interpretacji pierwszego. Wniosek 3 zawiera nieścisłość, ponieważ miano przeciwciał anti-ETAR nie korelowało z eGFR, więc nie

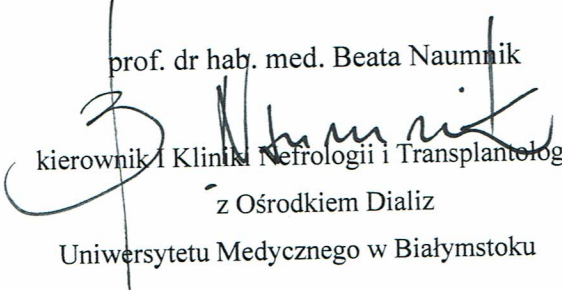
pozostawało „w pewnym związku z funkcją filtracyjną”, jak pisze Autor.

Dla porządku dodam, że piśmiennictwo liczy 184 pozycje i zostało skrupulatnie dobrane. Załączony spis tabel i rycin oraz indeks skrótów stanowczo ułatwia czytanie pracy. Załączone streszczenia liczą po 3 strony (wersja polsko- i anglojęzyczna), są rzeczowe i merytoryczne, co również ułatwia zapoznanie się z problemem. Zawierają jednak błąd: na str. 102 czytamy, że przeciwciała anty-ETAR przebadano w osoczu, podczas gdy w całej pracy Doktorant pisze o ich oznaczaniu w surowicy.

Moje podsumowanie dysertacji, którą miałam przyjemność recenzować jest jednoznaczne. Temat pracy, niezwykle aktualny i pożyteczny z punktu widzenia praktyki lekarskiej, jest bardzo dobrze wybrany. Jego realizację przeprowadzono poprawnie, z wykorzystaniem prawidłowego warsztatu badawczego. Doktorant wykazał się dużą wiedzą, którą poparł aktualnym piśmiennictwem, trafnie wykorzystanym we *Wstępie*, *Metodyce* i *Dyskusji*.

Równie jednoznaczny jest mój wniosek końcowy: praca pt. „Wybrane białka surowicy i moczu jako biomarkery aktywności choroby w układowym zapaleniu naczyń związanym z przeciwciałami przeciw cytoplazmie neutrofilów” autorstwa lek. med. Olumide Olatubosun Rowaiye wykonana pod kierunkiem prof. dr hab. med. Mariusza Kusztala spełnia wszystkie kryteria przewidziane odpowiednią ustawą wymagane na stopień doktora nauk medycznych.

W związku z powyższym składam na ręce Pani Dziekan Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu wniosek o dopuszczenie lek. med. Olumide Olatubosun Rowaiye do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

prof. dr hab. med. Beata Naumnik

kierownik I Kliniki Nefrologii i Transplantologii
z Ośrodkiem Dializ
Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku