

Dr hab. n. med. Grzegorz Oracz, Prof. IP CZD

Klinika Gastroenterologii, Hepatologii, Zaburzeń Odżywiania i Pediatrii

Instytut "Pomnik - Centrum Zdrowia Dziecka"

Al. Dzieci Polskich 20, 04-730 Warszawa

## OCENA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ LEK. MED. MILENY PADYSZ

zatułowanej: „**Ocena wybranych parametrów stanu zapalnego w korelacji z obrazem klinicznym choroby Leśniowskiego-Crohna.**”

Nieswoiste choroby zapalne jelit należą do grupy przewlekłych chorób zapalnych przewodu pokarmowego, przebiegających z okresami zaostrzeń oraz remisji. Zarówno w Polsce jak i na świecie obserwuje się stały wzrost zachorowań na chorobę Leśniowskiego-Crohna (ChLC), jak i na wrzodziejące zapalenie jelita grubego. Największy wzrost zachorowań obserwuje się w krajach wysokorozwiniętych, co prawdopodobnie związane jest z poprawą warunków socjoekonomicznych oraz zmianą stylu życia. W chwili obecnej problem ten dotyka tysięcy Polaków. Etiopatogeneza ChLC nadal nie jest w pełni poznana, co powoduje, że niestety nie istnieje w chwili obecnej przyczynowe leczenie tej choroby, a monitorowanie jej przebiegu i leczenie ciągle stanowi poważne wyzwanie dla lekarzy. ChLC przebiega z okresami remisji i zaostrzeń, w czasie których funkcjonowanie chorego ulega upośledzeniu. Istotnym jest fakt, że ChLC zazwyczaj dotyczy ludzi młodych - uczących się lub w szczycie wieku produkcyjnego i rozrodczego. Jak we wstępie podkreśla Autorka naukowcy od lat poszukują nieinwazyjnych markerów, które stanowiłyby szybką, wiarygodną i co istotne, tanią metodę oceny aktywności choroby. Do najczęściej oznaczanych parametrów stanu zapalnego w ChLC należy CRP, liczba leukocytów w morfologii krwi oraz odczyn Biernackiego (OB). Z uwagi na niską swoistość powyższych markerów, coraz większe znaczenie zyskuje oznaczenie kalprotektyny w stolcu. Zaburzeniom autoimmunologicznym i procesom zapalnym w ChLC towarzyszą zaburzenia krzepliwości krwi. Dochodzi do wzajemnych interakcji wyzwających

mechanizm błędnego koła, a kluczowym ogniwem łączącym te procesy mogą być płytki krwi. Jak do tej pory brak jest jednego markera aktywności choroby, który charakteryzowałby się wysoką swoistością i czułością. Dlatego tak ważnym i ciekawym wydaje się temat rozprawy doktorskiej, którego udźwignięcia podjęła się Autorka.

Przedstawiona mi do oceny praca doktorska porusza istotny i co ważne powszechny problem zdrowotny, jak i socjoekonomiczny, jakim jest choroba Leśniowskiego-Crohna. Praca poświęcona jest analizie korelacji wybranych parametrów morfologii krwi i parametrów biochemicznych z kalprotektyną w kale, jako najlepszego w chwili obecnej markera aktywności ChLC, oraz ze wskaźnikiem aktywności klinicznej Harvey-Bradshaw.

Rozprawa doktorska zbudowana jest w układzie typowym, zgodnie z wymaganiami stawianymi takiej pracy.

Rozprawa doktorska obejmuje wraz z piśmiennictwem, streszczeniem, rycinami i tabelami 127 stron wydruku komputerowego. Należy podkreślić świetne edytorskie opracowanie pracy (język pracy jest zrozumiały, jasny- praktycznie bez literówek), które obejmuje również 19 rycin, 4 wykresy, 22 tabele w głównym tekście oraz 18 tabel w Aneksie. Układ pracy jest prawidłowy.

W obszernym wstępie Doktorantka szeroko opisała epidemiologię, etiopatogenezę, przebieg kliniczny, metody diagnostyczne oraz sposoby leczenia choroby Leśniowskiego-Crohna. Wstęp wzbogacony jest o bardzo ciekawy rys historyczny ChLC. We wstępie Autorka przybliżyła też czytelnikowi sposoby oceny nasilenia choroby oraz sposoby jej klasyfikacji z jasnym wyjaśnieniem wartości diagnostycznych poszczególnych parametrów laboratoryjnych.

Rozdział ten wyczerpująco przedstawia informacje zarówno na temat ChLC, jak i procesów zapalnych, które tej chorobie towarzyszą.

Następnie Doktorantka przejrzysto uzasadnia przyczynę podjęcia tematu i nakreśla cele swojego badania obejmujące:

1. Ocenę stężenia białka C-reaktywnego, liczby białych krwinek w surowicy krwi oraz wskaźnika liczby neutrofilów do limfocytów (NLR) u pacjentów z chorobą

Leśniowskiego-Crohna w zależności od stopnia aktywności choroby ocenianej na podstawie wskaźnika Harvey-Bradshaw oraz na podstawie stężenia kalprotektyny w stolcu.

2. Ocenę parametrów płytkowych (liczby płytek krwi, wartości średniej objętości płytki krwi, płytkokrytu) oraz wskaźnika liczby płytek krwi do limfocytów (PLR) u pacjentów z chorobą Leśniowskiego-Crohna w zależności od stopnia aktywności choroby ocenianej na podstawie wskaźnika Harvey-Bradshaw oraz na podstawie stężenia kalprotektyny w stolcu.
3. Poszukiwanie korelacji pomiędzy wybranymi parametrami laboratoryjnymi a danymi demograficznymi oraz lokalizacją zmian zapalnych w przewodzie pokarmowym u pacjentów z chorobą Leśniowskiego-Crohna.
4. Analizę użyteczności diagnostycznej parametrów płytkowych w ocenie aktywności choroby Leśniowskiego-Crohna.

Przedstawione powyżej cele Pani Doktor Milena Padysz zrealizowała poprzez analizę wyników 100 pacjentów (50 kobiet i 50 mężczyzn) z chorobą Leśniowskiego-Crohna, rozpoznaną w oparciu o kryteria ECCO, hospitalizowanych w Klinice Gastroenterologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi lub leczonych w przyszpitalnej Poradni Gastroenterologicznej w latach 2015-2017. Do grupy kontrolnej zakwalifikowano 20 pacjentów hospitalizowanych w Klinice Gastroenterologii w latach 2016-2017, u których rozpoznano zespół jelita nadwrażliwego wg Kryteriów Rzymskich IV.

U wszystkich pacjentów przeprowadzono dokładne badanie podmiotowe i przedmiotowe oraz oceniono stan kliniczny wykorzystując wskaźnik Harvey-Bradshaw (HBI). Kwestionariusz własny obejmował dane takie jak: wiek pacjenta, czas trwania choroby oraz ocenę lokalizacji zmian zapalnych w obrębie przewodu pokarmowego ocenianą na podstawie wyników badań endoskopowych oraz radiologicznych (enterografia TK lub MRI) wykonanych w okresie ostatnich 3 miesięcy. Z pobranych próbek krwi każdy z pacjentów miał oznaczone wybrane parametry biochemiczne w surowicy oraz morfologię krwi. Stężenie kalprotektyny w stolcu oznaczono używając ilościowe, immunochromatograficzne testy (QUANTUM BLUE), skalibrowane w przedziale wartości 100 - 1800 µg/g.

Na badanie Autorka uzyskała zgodę Komisji Etycznej. Na szczególne podkreślenie zasługuje prospektywny charakter badania oraz to, że oznaczenie kalprotektyny w kale było wykonywane samodzielnie przez Doktorantkę.

Po analizie statystycznej wyników zostały one wyczerpująco przedstawione w osobnym rozdziale pracy. Liczne Wykresy i Tabele przejrzysto ilustrują wyniki pracy.

Porównanie wyników badań laboratoryjnych w grupie badanej i w grupie kontrolnej wykazało znamienne wyższe stężenia kalprotektyny, CRP, liczby płytek krwi, płytkokrytu i wskaźnika NLR oraz znamienne niższe wartości średniej objętości płytki krwi w grupie pacjentów z chorobą Leśniowskiego-Crohna. W analizie użyteczności diagnostycznej testu przeprowadzonej w grupie badanej i kontrolnej za pomocą krzywych ROC najwyższe wartości pola pod krzywą (AUC) uzyskano dla stężenia kalprotektyny (AUC 0,89) przy czułości 78% i swoistości 100%.

Kolejny etap analizy dotyczył oceny poszczególnych parametrów laboratoryjnych w grupie pacjentów z zaostrzeniem i remisją ChLC. Na podstawie stężenia kalprotektyny w kale powyżej 250 $\mu$ g/g wyodrębniono grupę 70 chorych z zaostrzeniem choroby oraz 30 chorych będących w remisji (stężenie kalprotektyny poniżej 250  $\mu$ g/g). Podobnego podziału dokonano przy pomocy wskaźnika Harvey-Bradshaw- 68 pacjentów z zaostrzeniem choroby (HBI  $\geq$ 5 pkt.) oraz 32 pacjentów w remisji (HBI <5pkt.).

W zaostrzeniu choroby Leśniowskiego-Crohna, określanym przy pomocy wskaźnika Harvey-Bradshaw, stężenie CRP, kalprotektyny, parametrów płytkowych (liczby płytek krwi i płytkokrytu) oraz wskaźnika PLR okazało się znamienne wyższe niż u chorych w remisji choroby. Liczba krwinek białych, wartość MPV oraz wskaźnik NLR nie korelowały ze wskaźnikiem Harvey-Bradshaw. W zaostrzeniu ChLC, określanym przy pomocy stężenia kalprotektyny, CRP, liczby krwinek białych, parametrów płytkowych (liczby płytek krwi i płytkokrytu) oraz wskaźnika NLR i PLR okazało się znamienne wyższe niż w remisji choroby, a w przypadku średniej objętości płytki krwi znamienne niższe. W tym przypadku analiza użyteczności diagnostycznej testu wykazała największe pole pod krzywą ROC dla liczby płytek krwi, które wyniosło 0,759. Przy punkcie odcięcia 239 tys. stwierdzono wysoką czułość (84%), swoistość (61%) oraz dużą dokładność testu (77%).

W dalszej części pracy Doktorantka przeprowadziła obszerną i dojrzałą dyskusję opartą na uzyskanych przez siebie wynikach badań oraz kilkudziesięciu pozycjach piśmiennictwa krajowego i zagranicznego. Jest to bardzo dobrze opracowana część rozprawy. Doktorantka pokazuje doskonałą znajomość omawianej tematyki. Ponadto, umiejętnie interpretując wyniki, Autorka przedstawia ich interesujące i szerokie uzasadnienia.

Całość rozprawy zakończona jest właściwym sformułowaniem czterech wniosków. Podkreślają one, że istotnie wyższe wartości w zakresie liczby płytek krwi, płytkokrytu oraz wskaźnika liczby płytek krwi do limfocytów w aktywnej postaci choroby Leśniowskiego-Crohna wskazują na wysoką wartość tych oznaczeń jako markerów oceny aktywności choroby.

Jak wynika z Pracy Doktorskiej liczba płytek krwi charakteryzuje się najwyższą mocą diagnostyczną i czułością testu w rozpoznawaniu stanu zaostrzenia i remisji choroby Leśniowskiego-Crohna wśród pacjentów z niskim stężeniem CRP. Oznaczanie stężenia CRP wykazuje natomiast wyższą wartość w porównaniu do liczby białych krwinek i wskaźnika liczby neutrofilów do limfocytów w ocenie aktywności choroby Leśniowskiego-Crohna.

Jak wnioskuje Autorka stężenie kalprotektyny zależy od lokalizacji zmian zapalnych w jelicie i jest istotnie wyższe u pacjentów z lokalizacją zmian w jelicie grubym.

Załączone piśmiennictwo obejmuje 161 pozycji, przede wszystkim są to publikacje naukowe z ostatnich lat. Piśmiennictwo zostało wykorzystane w całej rozprawie w sposób wysoce racjonalny.

## **WNIOSKI:**

Doktorantka w przedstawionej pracy prawidłowo sformułowała założenia, cel oraz należycie dobrała grupy badane.

Wyniki zostały sumiennie zgromadzone, zilustrowane szeregiem tabel i wykresów. Materiał został poddany analizie statystycznej za pomocą odpowiednio dobranych narzędzi statystycznych. Interpretacja wyników z dyskusją jest bardzo dobra, zakończona prawidłowymi wnioskami. Piśmiennictwo wybrano umiejętnie i wykorzystano następnie w obszernej dyskusji.

### **Znaczenie pracy:**

Wyniki i wnioski pracy wskazują na istotne znaczenie analizy stężeń kalprotektyny, CRP oraz parametrów płytkowych- liczby płytek krwi, średniej objętości płytki krwi, płytkokrytu i wskaźnika PLR w różnicowaniu choroby Leśniowskiego-Crohna z czynnościowymi zaburzeniami jelit. W rozpoznawaniu stanu zaostrzenia i remisji choroby Leśniowskiego-Crohna, najwyższą przydatnością kliniczną spośród badanych markerów charakteryzowały się liczba płytek krwi i płytkokryt oraz stężenie kalprotektyny.

Wyniki uzyskane przez Doktorantkę wskazują na brak jednego markera biochemicznego, który byłby charakterystyczny tylko i wyłącznie dla choroby Leśniowskiego-Crohna i który zapewniałby nam w wystarczającym stopniu ocenę zarówno nasilenia jak i lokalizacji choroby.

Uzyskane wyniki zwracają uwagę na nie do końca doceniane obecnie w ChLC parametry krzepnięcia krwi, a w szczególności liczbę płytek i związane z nimi wskaźniki, które zgodnie z wynikami pracy powinny na stałe wejść do praktyki klinicznej oceny nasilenia choroby , szczególnie jeżeli uwzględnimy powszechność i niski koszt ich wykonania.

Na zakończenie chciałem zwrócić uwagę, że praca została wykonana w ośrodku o najwyższym doświadczeniu naukowym, pod okiem wybitnego nauczyciela jakim jest Pani Profesor Anita Gąsiorowska.

### **Uwagi:**

Z obowiązku recenzenta, nie umniejszając wartości pracy, pragnę zwrócić uwagę na poniższe elementy:

1. Pewnym ograniczeniem przedstawionej mi do recenzji pracy jest nie uwzględnienie leków które chorzy przyjmowali. Zarówno bardziej tradycyjne leki immunosupresyjne jak i leczenie biologiczne mogą z pewnością wpływać na badane przez Doktorantkę parametry, w tym na liczbę płytek, a z całą pewnością na liczbę leukocytów. Jest to w zasadzie jedyna istotna uwaga dotycząca Rozprawy. Proponuję uzupełnić przyszłą publikację o te dane.

2. W wykazie skrótów nie wszystkie zastosowane skróty zostały rozwinięte (np. FDA, fl, PDW, czy P-LCR).
3. Według mojej wiedzy (z wykładu na DDW) doktor Burill Bernard Crohn, który nie był pierwszą osobą która opisała chorobę po angielsku, i który tylko dołączył do zespołu, do końca życia, przy każdej okazji, walczył o nazwę choroba Crohna na każdym zjeździe i spotkaniu AGA, a nie jak pisze Doktorantka nigdy nie uznał nazwy „choroba Crohna”.
4. W Tabeli 2. w pozajelitowych manifestacja ChLC nie ujęto zapaleń trzustki, a szczególnie autoimmunologicznego zapalenia trzustki, które przez wielu autorów uznawane jest jako manifestacja pozajelitowa chorób zapalnych jelit.
5. W Założeniach Pracy Autorka podaje, że „Coraz częściej stosowanym nieinwazyjnym testem przydatnym w ocenie skuteczności leczenia jest oznaczanie kalprotektyny w kale. Test ten cechuje się wysoką swoistością i czułością diagnostyczną, ale jest stosunkowo drogi i z tego względu nie zawsze dostępny.” Moim zdaniem obecnie ocena kalprotektyny w kale jest standardem diagnostyki choroby, a cena, która nie powinna wpływać na wykonywanie badania, z roku na rok się obniża.
6. Tabela 13. Średnia wartość płytek w grupie kontrolnej podana w Tabeli (221,2tys.) nie zgadza się ze średnią wartością płytek podaną w tekście (151,7tys). Która wartość jest prawdziwa? Czy nie wpływa to na wynik analizy statystycznej?
7. Tabela 19. Analiza krzywych ROC. Dokładność kalprotektyny podana w Tabeli wynosi 62%, podczas gdy w tekście 65%. Która wartość jest prawdziwa? Czy nie wpływa to na wynik analizy statystycznej?
8. Tabele w Aneksie powinny być ponumerowane. Dzięki temu byłyby bardziej czytelne.

**Podsumowując, stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska lek. med. Mileny Padysz zatytułowana: „Ocena wybranych parametrów stanu zapalnego w korelacji z obrazem klinicznym choroby Leśniowskiego-Crohna.” odpowiada warunkom określonym w ustawie z dnia 14.03.2003r o stopniach naukowych i tytule naukowym w zakresie sztuki (Dz.U. nr 65 poz.595) z późniejszymi zmianami. Wnoszę do Rady Wydziału Wojskowo-Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi o dopuszczenie lek. med. Mileny Padysz do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

Dobry, sumiennie opracowany merytorycznie warsztat metodologiczny oraz dojrzałość opracowania naukowego zapewnia szybkie opublikowanie wyników pracy. Zachęcam Doktorantkę do opublikowania wyników pracy w wysoko punktowanym czasopiśmie międzynarodowym. **Tym samym też wnioskuję o wyróżnienie przedstawionej mi do recenzji rozprawy doktorskiej.**

Dr hab. n. med. Grzegorz Oracz, Prof. IP CZD

Warszawa, 29.06.2019r



**Prof. nadzw. dr hab. n. med.  
Grzegorz Oracz  
gastroenterolog, pediatra  
6195179**