

Oponentský posudek disertační práce

Využití zánětlivých biomarkerů v predikci a diferenciální diagnostice závažnosti akutní pankreatitidy

(autor. MUDr. Pavel Malina)

Uvedená disertační práce byla zpracována v rámci doktorského studijního programu Lékařská chemie a biochemie na Lékařské fakultě University Palackého v Olomouci. Školitelem uchazeče byl Ing. Dalibor Novotný, Ph.D. Práce vycházela ze studia v období 09/2009 – 02/2015 a její část byla podpořena interním grantovým projektem LF UP.

Předkládaná práce má celkem 156 stran (včetně literatury, která čítá celkem 257 citací). Je členěna celkem do 6 kapitol (plus seznam vlastních publikací a seznam literatury).

Odborné posouzení

Práce se zabývá závažnou klinickou i experimentální problematikou, tedy včasnou diagnostikou a především snahou o nalezení parametrů, které by včas (dříve než klinické vyšetření) odhadly další rozvoj choroby a riziko pro pacienta. To je v případě tak závažné diagnosy, jakou je akutní pankreatitida, velmi potřebné a závažné. Práce vychází z velmi solidního teoretického základu a rozboru, má ale vlastní část klinickou, rozdělenou do dvou studií.

V teoretické části se práce zaměřuje na několik laboratorních parametrů, které mohou odpovídat na zadané cíle – tedy na proteiny akutní fáze, cytokiny a interleukiny (do kterých autor řadí i adipokiny a FGF-21). Všechny zmíněné (i další) biomarkery jsou velmi zodpovědně rozebrány a komentovány, včetně jejich potenciálního vztahu k akutní pankreatitidě. Údaje jsou moderní, dobře zpracované. Neméně dobře je zpracované téma pankreatitidy a vazby všech zmíněných parametrů k diferenciální diagnostice či individuálního posouzení vývoje choroby.

Podstatou disertačního úsilí petenta je pochopitelně experimentální část práce. Ta je zpracována ve dvou více-méně samostatných studiích.

První studie vychází z rozboru nálezů u 59 pacientů vyšetřených ve vlastním zařízení uchazeče, tedy v nemocnici v Písku. Je zaměřena především na proteiny akutní fáze a interleukiny. Jejich výrazný vzestup pochopitelně není překvapivý. Přínosné je ale zjištění, že v závěru prvního týdne po vzniku choroby lze s dobrou pravděpodobností odlišit podle hodnot

CRP a IL-6 další vývoj chorobného stavu, především odlišit přítomnost či nepřítomnost infekce.

Druhá studie hodnotila data od 84 pacientů a rozšířila pohled o adiponektin, adipocytární vazebný protein pro mastné kyseliny (A-FABP) a FGF-21. Současně brala do hodnocení i zobrazovací techniky, především CT s využitím Balthazarova skóre a indexu závažnosti. I zde výsledky potvrzují nejvyšší výpovědní hodnotu až ve čtvrtém dni. Zahrnutí zobrazovací techniky do posuzování výrazně zlepšuje výpovědní sílu laboratorních vyšetření a současně naznačuje, že toto radiačně velmi zatěžující vyšetření (CT) lze vhodně doplnit nezatěžujícími laboratorními parametry.

V kapitole „diskuse“ autor zodpovědně, s patřičnou dávkou entuziasmu a současně zdravého skepticismu posuzuje výsledky a jejich dopad do experimentální, ale především klinické praxe.

V cílech práce bylo

- Analyzovat možnost diferenciální diagnostiky sterilní a infekcí komplikované akutní pankreatitidy pomocí sériových analýz sérových hladin IL-6
- Srovnat výpovědní hodnotu adiponektinu, FGF-21 a A-FABP s „klasickými“ zánětlivými markery
- Možnost využití těchto „moderních“ markerů pro predikci vývoje choroby
- Sledovat vzájemnou asociaci všech uvedených biomarkerů

Při posuzování práce je možno konstatovat, že všechny uvedené cíle byly splněny a výsledky jsou zodpovědně hodnoceny a rozebrány.

Přesto mám k autorovi několik poznámek a otázek:

1. na straně 25 je uvedeno, že prokalcitonin je „hormon tvořený jaterními buňkami“. Autor sám přitom na straně 35 správně uvádí, že tento hormonální prekursor je tvořen v parafolikulárních buňkách štítné žlázy. Předpokládá se sice syntéza prokalcitoninu v akutních stavech též imunokompetentními buňkami, ale o hepatocytech není v literatuře dostatek solidních důkazů
2. i když interleukiny a cytokiny mají auto- či parakrinní efekt, nejsou obvykle řazeny mezi hormony – nesplňují jiné podmínky (sekrece „žlázami s vnitřní sekrecí“ atd)
3. autor zmiňuje, že jednou z výrazných výhod sledovaných biomarkerů je rychlý TAT (turn-around-time), což je v kritických stavech mimořádně důležité. Může to autor podrobněji rozebrat i s ohledem na možnost POCT?
4. Co autor doporučuje do rutinní praxe a s jakým časovým zařazením?

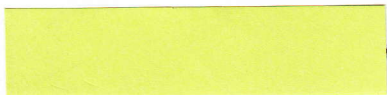
Závěr:

Práce je velmi pečlivě zpracována. S potěšením mohu konstatovat, že cíle stanovené disertační prací byly zodpovědně splněny. Autor se zaměřil na možnost zlepšit a zrychlit diagnostiku a predikci vývoje akutní pankreatitidy s využitím relativně snadno dostupných biomarkerů a jejich stanovením v biologických tekutinách. Součástí práce je velmi pěkný přehled moderních biomarkerů a dosavadních poznatků o možnostech jejich využití. Je zřetelné, že autor se dobře pohybuje i v klinické i v laboratorní části práce, s výhodou zařadil do studie i zobrazovací techniky a jejich korelaci s vlastními nálezy.

Práce má velmi dobrou úpravu a překlady či nepřesná vyjádření jsou velmi ojedinělé. Výsledky jsou dobře zpracované a bohatě graficky dokumentované.

Publikační aktivita autora odpovídá požadavkům fakulty na absolventa doktorského studijního programu.

S posouzením všech zmíněných skutečností **předloženou disertační práci jednoznačně doporučuji k obhajobě a po jejím absolvování doporučuji, aby uchazeči byl v souladu s § 47, Zákona o vysokých školách č.111/98 Sb. v platném znění udělen akademický titul doktor, ve zkratce Ph.D. za jménem.**



Prof. MUDr. Vladimír Palička, CSc., Dr.h.c.

V Hradci Králové dne 28. března 2015

OPONENTSKÝ POSUDEK DISERTAČNÍ PRÁCE

**VYUŽITÍ ZÁNĚTLIVÝCH BIOMARKERŮ V PREDIKCI A DIFERENCIÁLNÍ
DIAGNOSTICE ZÁVAŽNOSTI AKUTNÍ PANKREATITIDY**

AUTOR: MUDr. Pavel Malina

OPONENT: Prof. MUDr. David Stejskal, Ph.D., MBA

Olomouc, 5.3. 2015

1. Formální popis

Předkládaná disertační práce obsahuje celkem 156 stran, 67 obrázků a 26 tabulek. Autor přikládá seznam 7 prací vztahujících se k vlastnímu tématu. Dvě z nich jsou původní vědecké publikace v časopisech s IF, kde figuruje spoluautor a 3. je v recenzním řízení, kde mám informace od školitele, že byla přijata. Současně autor přikládá seznam 10 souvisejících přednášek a posterů, kde je buď prvním autorem nebo spoluautorem. U přednášky, citované pod číslem 8 (Novotný D, Malina P. Prozánětlivý HDL..., prezentace na pracovním dnu ČSKB v roce 2012), kde není hlavním autorem si dovoluji vyslovit pochyby nad tím, zda-li byla doprovázena abstraktem, a tudíž bych ji do seznamu nezahrnoval. Nicméně, i přes tuto drobnou nepřesnost autor splňuje formální požadavky z hlediska prezentace své vědecké práce.

Disertační práce je rozdělena do kapitol, které odpovídají struktuře a zaměření jednotlivých stanovených cílů. Kapitoly jsou následně členěny do podkapitol. Členění disertační práce je logické a odpovídá formálním zvyklostem. Seznam referencí je obsáhlý, autor sleduje soudobou vědeckou literaturu.

2. Aktuálnost tématu a zpracování

Autor se zaměřuje na laboratorní diagnostiku a diferenciální diagnostiku akutní pankreatitidy (AP), resp. pankreatické nekrózy a na možnost predikce vzniku AP pomocí laboratorní analýzy s důrazem na stanovení vybraných zánětlivých ukazatelů a adipokinů. Za tímto účelem jsou klinicky ověřovány efektivitu sériového stanovení C-reaktivního proteinu (CRP) a Interleukinu-6 (IL-6) z hlediska diferenciální diagnostiky a adiponektinu, FGF-21, A-FABP, CRP, IL-6 a prokalcitoninu (PCT) z hlediska predikce AP.

Z pohledu rutinní diagnostiky i výzkumu jde o zajímavé téma, kde probíhá intenzivní hledání nových ukazatelů, které by umožnily urychlit, zpřesnit a zefektivnit uvedenou predikci AP i diferenciální diagnostiku těžkých forem AP. Laboratorní vyšetření sehrávají na tomto poli zcela zásadní význam, vzhledem k patofyziologii choroby, stále se rozšiřující diagnostické paletě i zkracující se době odezvy získání výsledku z laboratoře (TAT). To potvrzuje i jejich vysoký cost benefit, jejich zapracování do automatických analytických systémů a postupné zavádění dříve neznámých parametrů do běžné rutinní praxe. V tomto ohledu je práce aktuální, přínosná a lze ocenit zejména její potenciální vazbu a využití právě pro běžnou diagnostiku.

Zvláště oceňuji výběr adipokinů, které autor pečlivě vybral z široké nabídky, a jejichž vztah k AP studoval. Je zjevné, že výběr byl založen na sledování recentních vědeckých poznatků. Zvolené metodické postupy jsou v lékařské diagnostice využívány již řadu let.

Klinické pilotní studie jsou vedeny a vyhodnoceny v souladu s vědeckými zvyklostmi.

3. Cíle práce

Autor si stanovil dva hlavní cíle práce, které jsou deklarovány na str. 50. Prvním cílem je analyzovat možnost diferenciální diagnostiky pankreatické nekrózy u těžké AP sériovým stanovením IL-6; druhý cíl je rozdělen na několik částí, které se věnují problematice vztahu vybraných adipokinů a zánětlivých ukazatelů navzájem během AP a jejich ev. možnost k predikci vzniku AP. Tomuto zadání odpovídá i celkový objem práce a počet tabulek. Lze konstatovat, že cíle práce byly sice splněny, ale vzhledem k drobným nejasnostem, které se týkají citací, metodické části práce, výsledků i diskuse, které jsou uvedeny v bodě 4, si některé z nich zasluhují i objasnění, - viz kapitoly 4. a 6. (připomínky a 15 dotazů).

4. Jazyková a formální úprava, připomínky k práci

- 4.1. *Výskyt častých formálních, ale i pravopisných chyb považuji za slabší bod předloženého textu. Zatímco jazykový projev odpovídá běžným zvyklostem a nemám k němu vážnějších připomínek a v řadě případů je až nadstandardní; práce trpí obsáhlým počtem formálních chyb, které její význam místy dehonestují. Např. pravopisné chyby (měkké i vs. tvrdé y tvrdé na konci slovesa, „průměrné BMI“ (např. strana 81), „adiponectin vs. adiponektin, „rozdělené“ (např. str. 81), ve větě chybí sloveso (např. strana 80 - „Komolgorův..“; „skupinamin“; opakované chyby od strany 83-89 v nadpisech, další pravopisné chyby str. 108, 110, 120 atp.), absence prvního autora v seznamu vlastních přednášek a posterů, překlepy, chyby v datech, odkazech či počtech (např. objev genu pro leptin v roce 1990 – správně 1994; na str. 46 je odkaz na neexistující kapitolu 2.2.5.2 ohledně Ransonových kritérií - tato kapitola je správně 2.2.6., odkaz na tabulku 1 na straně 54, přičemž tabulka je očíslována číslem 2; tabulka 1 je umístěna na straně 34. Číslování odkazů na publikace není úplně souvislé, ale „napřeskáčku (např. publikace 175; poté 206). Práci by podle mého názoru prospělo, kdyby autor citoval spíše než nesouvislémi čísly v řadě jmény autorů.*

4.2. Je zjevné, že práce byla opakovaně přepracovávána i doplňována (což není na závadu), nicméně uvedené chyby jsou zřejmě generovány nedostatečnou kontrolou textu, odkazů. Za nejvíce problematickou vidím absenci návaznosti citací na text, kdy čísla, která označují publikace neodpovídají realitě. Předpokládám, že autor doplní k disertaci errata a správně číslované odkazy.

4.4 Grafická úprava – tabulky, grafy a obrázky. Doporučuji, aby v ROC grafech (např. obr. 20-26) bylo uváděno česky senzitivita a specificita a nebyly používány anglické názvy (obr. 65-67 jsou dokonce celé v angličtině a zcela v jiném designu než předchozí). Disertační práci je na škodu, že autor nevyužil stejnou verzi programu Medcalc pro grafy, které se podstatně liší ve studii I a II (kde je navíc oranžově v tyčovém grafu uveden interval, který není vysvětlen – jde o 95% interval spolehlivosti pro medián?; ve studii II jsou popsány odlehle hodnoty a hodnoty p , což ve studii I naopak chybí). Proč autor nepracoval s jednotným grafickým designem statistického zpracování ve všech případech? Formálně (nikoliv obsahově) to zbytečně znehodnocuje celou disertaci. Některé tabulky jsou hůře přehledné a šly by nahradit statisticky elegantnějším nástrojem (tab. 2-3), řada údajů v tabulkách je identická a opakuje se, některé obrázky by šly sjednotit a významně by se tím zlepšila přehlednost práce, i když uvedený formát není chybný (viz dále). Podobně považuji za zbytečné uvádět (navíc poměrně nešťastnou formou, která zabírá místo a snižuje pozornost čtenáře) graficky souvislosti stanovených ukazatelů s CSTI (Obr 31, 34, 37, 40, 43, 46, 49, 52, 55, 58). Bohatě stačí pouze zmínka o výsledcích v textu. Výsledky by se tak podstatně zpřehlednily. Hladiny (hodnoty) významnosti (p) jsou na několika místech uvedeny chybně 0,000 (např. strana 102, 107, 109, 111, 119, atp.); správně je $< 0,001$.

4.5 Vlastní obsah kapitol - pokud se budu věnovat podrobněji obsahu:

- 4.5.1 Souhrn: autor do experimentální části vypisuje i výsledky a to tak, že je vpisuje přímo za metodiku k jednotlivým studiím, což je formálně neobvyklé.
- 4.5.2 Vyzdvihují rozsáhlý úvod, který obsahuje 25 stran a problematika je velice zdařile popsána. Možná bych doporučil zmínit i další potenciální experimentální laboratorní ukazatele jako je např. kachexin a další, ale to může být i v diskusi. Metodická část je rozdělena zcela atypicky a neodpovídá podle mého názoru běžným zvyklostem.
- 4.5.3 V experimentální části 4.1. je podle mě navíc část 4.1.1.2 a 4.1.2.2, která popisuje stanovení adipokinů a patří do jiné studie. Je zřejmé, že jsou uvedené chyby způsobeny opakovaným přepisováním a kopírováním práce. Tab. 2 patří do výsledků a ne do metodiky.
- 4.5.4 Je poměrně nezvyklé, když nejprve autor prezentuje 2 tabulky a 12 grafů a teprve poté výsledky slovně interpretuje. Přitom ne všechny grafy jsou podloženy daty v tabulkách nebo v textu (obr. 27 a 28). Čtenáři tím ztěžuje

orientaci. Vhodnější by bylo popsání výsledku a následně jeho grafické či tabulární vyjádření.

- 4.5.5 V části 4.3. se autor opět vrací k problematice metodiky, nyní druhé studie, což je formálně problematické. Zde platí mé výtky uvedené 4.5.3. Metodika je ve II. studii popsána zcela jinak než v první studii (tedy zvlášť technika, zvlášť reagentie a analytické charakteristiky), přitom by měla být v disertaci sjednocena.
- 4.5.6 Z tabulky 13 (strana 107) nevyplývá, že by autor statisticky porovnával hodnoty BMI u osob s těžkou a lehkou AP. Navíc, v této tabulce (která je velice přehledná) se opakují údaje z obrázků 29-45, které jsou v případě nevýznamných změn podle mého zbytečné a uvedl bych naopak jen změny statisticky významné, a to i v čase mezi 1. a 2. náběrem). Stejně tvrzení platí u korelací, což jsem uvedl již výše.
- 4.5.7 Diskuse obsahuje 11 stran. Jako problém celé diskuse vidím fakt, že v podstatě autor memoruje opět výsledky vč. hodnot, které již (a někdy nejednou) prezentoval a čtenář se tak v textu ztrácí. Za kritický problém považuji autor odkazuje na svoje publikace, které má uvedeny chybně i v seznamu literatury, avšak pod zcela jiným číslem. Po podrobnějším prostudování odkazů lze jednoduše zjistit, že citace literatury někde v relacích 170 a výše neodpovídají a citované údaje tak nelze bez znalosti problematiky absolutně ověřit. Věřím, že bude obratem řešeno v rámci errata.
- 4.5.8 K závěrům nemám připomínek

5 Význam a přínos disertační práce

Jak je uvedeno výše, je práce přínosná zejména výběrem stanovení zatím ještě neměřených analytů z hlediska cílů studie (myšleno vybraných adipokinů). Jde o pilotní studie, nižší počet probandů zde není na závadu. Na vlastní disertaci si cením především níže uvedených skutečností:

- demonstrace pravděpodobně vlastního algoritmu pro diferenciální diagnostiku těžké AP, který autor se spolupracovníky zavedl na svém pracovišti
- prezentaci vysoké „NPV-“, u stanovení CRP v predikci těžké AP především 4.den po přijetí pacientů
- zatím nepublikované nálezy, které se týkají prognózy AP a koncentrace vybraných adipokinů a prezentované hypotézy

6 Dotazy na disertanta

6.1. Vysvětlíte co znamenají oranžová pole v grafech z programu Medcalc ve studii II, ev. se krátce vyjádřete k připomínkám ke statistickému zpracování uvedených v bodě 4.

6.2. Nerozumím zdůvodnění a formálnímu vysvětlení na straně 52, že při statistickém zpracování byl použit průměr hodnot markerů ze dnů 5 a 6 a dále 7 a 8. V tabulkách 4-5 (na str. 71 např. tab. 6) jsou totiž ve dnech 5 a 6 uvedeny rozdílné hodnoty. Můžete zdůvodnit postup i možnou statistickou chybu? Ev. nějak vyjádřit?

6.3. Na straně 72 jsou dva grafy (obr. 27 a 28), které znázorňují hodnoty pouze u IL-6 (ne však u CRP) a vůbec nejsou doloženy hodnotami (statistickými daty). Proč není uvedeno stejné hodnocení pro CRP jako pro IL-6? Proč nejsou grafy (obrázky) podloženy daty v tabulce nebo v textu? Jste je schopni doložit?

6.4. Ve výsledcích i diskusi píšete, že uvedené hodnoty cut-off IL-6 jsou rutinně užívány v rámci chirurgického oddělení v nemocnici, kde pracujete, od roku 2011. První práci na toto téma jste však publikoval v roce 2012 (i když již dříve jste o problematice o AP přednášel), proto můj dotaz zní zda-li nejde o překlep a vychází-li algoritmus z uvedené studie na poměrně malém souboru pacientů nebo z jiných prezentovaných dat.

6.5. Kriterialem zařazení do studie II bylo 5x zvýšení aktivity amylázy v séru nad horní referenční mez. Nebylo by vhodnější využít kombinace stanovení aktivity lipázy a např. CRP? Jak byla ošetřena ev. přítomnost makroamylasemie?

6.6. Chybí anamnestická data o ev. doprovodných onemocněních, jsou k dispozici?

6.6 Chybí informace, zda-li byly všechny studie schváleny etickou komisí (uvedeno pouze u studie II). Byla studie I schválena, kdy a kde a kým?

6.7 Mohl byste vysvětlit diskrepanci počtu vyšetřených osob pomocí CT s kontrastem ve studii II (47 vs. 84 osob)? Na straně 75 píšete, že všichni pacienti měli provedeno CT vyšetření. Na straně 79 píšete, že 47 osob podstoupilo CT vyšetření s kontrastem.

6.8 T tabulky 11 vyplývá, že u těžší forma idiopatické AP se vyskytuje při klasifikaci dle CTSI u 10%; z tabulky 12 je popisována u 36% pacientů (přitom použitá forma klasifikace se dle metodiky liší pouze o 1 bod CTSI). Můžete to vysvětlit?

6.9 Z obr. 35 na straně 87 je zřejmé, že řada výsledků FGF-21, které byly analyzovány z náběru 1.den hospitalizace byla u osob s lehkou formou AP nad mezí stanovitelnosti. Tato skupina měla přitom nižší průměrné hodnoty BMI než osoby a těžkou AP. To je vzhledem k popsanému vztahu mezi BMI a FGF21 zajímavé. Jak si nález vysvětlujete?

6.10 Vysvětlete, jak je možné, že obrázek 38, kde je koncentrace FGF-21 nad mezí stanovitelnosti při počtu měření cca 12 odpovídá dle obrázku 37 v rámci korelace, kterou uvádíte, pouze 5 měřením. Jde o shodná data (počítání bodů) nebo neúplnou statistiku?

6.11 Z tabulky 13 (strana 107) vyplývá, že jste statisticky neporovnávali hodnoty BMI u osob s těžkou a lehkou AP. Tyto údaje chybí i u dalších tabulek. Z jakého důvodu?

6.12 Jak vysvětlíte zcela absolutně diskrepantní údaje, které uvádíte u IL-6, kdy podle Mann Whitney U testu (4. den - obr. 59-60) nebyly difference koncentrací IL-6 u skupiny s lehkou a těžkou AP významné, nicméně dle Vámi uvedené tabulky statisticky významné za použití stejného testu byly.

6.13 Ve Vaší studii jste neprokázal, podobně jako jiní autoři, souvislost mezi ADN a závažností AP, nicméně popisujete nálezy z literatury, kde byl nalezen negativní trend mezi ADN a tíží AP. Ve své práci jste v rámci predikce však prokázal naopak u AP nezávislý vztah mezi zánětlivými markery a hodnotou ADN, kdy byla hodnota ADN nezávisle asociována s tíží AP. Jak tento diskrepantní nález vysvětlíte?

6.14 Překvapením je pro mě zcela nová informace o absenci vztahu mezi AP, její závažností a koncentrací A-FABP v séru. Tato problematika je velice zajímavá a jistě by si zasloužila podrobnější diskusi, už proto, že jde o první stanovení tohoto ukazatele v rámci uvedené diagnózy vůbec. Jaký je Váš názor na uvedenou problematiku?

6.15 Za zajímavou považuji neexistenci vztahu mezi BMI a FGF-21. Lze předpokládat, že se FGF-21 chová v podobných případech podobně jako u metabolického syndromu, kdy jeho koncentrace v séru roste jako obranná reakce organismu. Jaký je Váš názor na úlohu FGF-21 u pacientů s AP? Lze podle Vás předpokládat, že snížení hodnot u těžkých AP by mohlo signalizovat zhoršení prognózy (analogie např. s IL-10?). Existuje podle Vašeho názoru rezistence k FGF-21? A jak by mohla být zprostředkována?

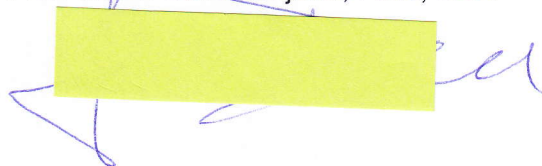
Závěr:

Předkládaná disertační práce je hodnotná, což je mj. demonstrováno řadou dílčích publikací v časopisech s IF. Přes uvedené nedostatky odpovídá současným vědeckým trendům. Doporučuji autorovi a jeho spolupracovníkům dále testovat jimi definované hypotézy na větších souborech pacientů, nejlépe v rámci multicentrické studie. Pro zajímavost a aktuálnost tématu by tato myšlenka byla podporována ať již v rámci připravované výzvy MZČR nebo dotačního fondu Horizon 2020 EU.

Proto doporučuji tuto práci k obhajobě a doporučuji, aby na základě její úspěšné obhajoby byl MUDr. Pavlu Malinovi udělen akademický titul doktor ve zkratce Ph.D., podle § 47 Zákona o vysokých školách č. 111/98 Sb.

V Olomouci 5.3. 2015

Prof. MUDr. David Stejskal, Ph.D., MBA



Prof. MUDr. David Stejskal, Ph.D., MBA