



UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI
LÉKAŘSKÁ FAKULTA

Děkanát, tř. Svobody 8, 771 26 Olomouc, tel./fax: 585 632 063

V Olomouci 20. dubna 2015

Zápis o konání obhajoby disertační práce v oboru Lékařská chemie a biochemie

MUDr. Pavel Malina, vedoucí lékař Oddělení klinické biochemie, Nemocnice Písek, a.s. a student kombinované formy doktorského studijního programu *Lékařská chemie a biochemie* na LF UP v Olomouci.

Téma práce: „Využití zánětlivých biomarkerů v predikci a diferenciální diagnostice závažnosti akutní pankreatitidy“

Obhajoba se konala v Olomouci dne 20. dubna 2015 v 13:00 hod.

Komise:

předseda: prof. RNDr. Jitka Ulrichová, CSc. ✓

místopředseda: doc. Ing. Kateřina Valentová, Ph.D. ✓

členové: doc. RNDr. Věra Klimešová, CSc. ✓

prof. MUDr. Vilém Šimánek, DrSc. ✓

prof. MUDr. David Stejskal, Ph.D., MBA ✓

Oponenti:

prof. MUDr. David Stejskal, Ph.D., MBA ✓

Středomoravská nemocniční, a.s. Prostějov

prof. MUDr. Vladimír Palička, CSc. ✓

Ústav klinické biochemie a diagnostiky LF UK

Školitel: Ing. Dalibor Novotný, Ph.D. ✓

Předseda komise přednesl stručnou charakteristiku uchazeče, hodnocení školitele a vedoucího školicího pracoviště. Poté uchazeč vyložil podstatný obsah své disertace. Oponenti přednesli své posudky. Uchazeč odpověděl na připomínky a dotazy oponentů.

Ve vědecké rozpravě vystoupili: viz příloha – zápis o diskusi.

Hlasování se účastnilo ...5... členů komise. Kladně hlasovalo ...5... členů, záporně ...0... členů, neplatných lístků bylo odevzdáno ...0...

Usnesení:

Přítomní členové komise tajným hlasováním rozhodli, že **MUDr. Pavel Malina** obhájil disertační práci a doporučili udělení akademického titulu doktor ve zkratce Ph.D. dle § 47 Zákona o vysokých školách č. 111/98 Sb.

.....
prof. RNDr. Jitka Ulrichová, CSc.
předseda komise

Zápis z průběhu diskuze

OBHAJOBA DISERTAČNÍ PRÁCE

MUDr. Pavel Malina

Využití zánětlivých biomarkerů v predikci a diferenciální diagnostice závažnosti akutní pankreatitidy

20. 4. 2015 v 13:00 hodin, Ústav

Oponenti:

prof. MUDr. David Stejskal, Ph.D., MBA – Středomoravská nemocniční, a.s. Prostějov

prof. MUDr. Vladimír Palička, CSc. – Ústav klinické biochemie a diagnostiky LF UK Hradec Králové

Komise:

Předseda: prof. RNDr. Jitka Ulrichová, CSc.

Místopředseda: doc. Ing. Kateřina Valentová, Ph.D.

členové: doc. RNDr. Věra Klimešová, CSc.

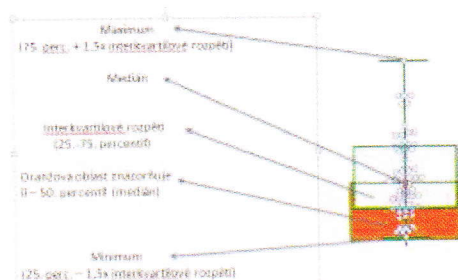
prof. MUDr. Vilím Šimánek, DrSc.

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

Odpovědi na otázky oponentů:

prof. Stejskal:

otázka 6.1: Vysvětlení krabicového grafu dle následujícího obrázku:



otázka 6.2: Průměr hodnot markerů ve studii I ze dne 5+6 a 7+8 byl použit z důvodu částečně chybějících dat. V případě dat dostupných z obou dnů, se použil průměr, v případě pouze jedné hodnoty se použila tato. Statistickou chybu to nepochybně zvyšuje.

otázka 6.3: Str. 72, obr. 27, 28: Tabulky hodnot pro C-reaktivní protein nejsou prezentovány, protože nebyl nalezen statisticky významný rozdíl mezi skupinami se sterilní a infikovanou nekrózou. Data jsou k dispozici, prezentována jsou pouze formou grafu.

otázka 6.4: Algoritmus využívající interleukin-6 je v nemocnici Písek používán skutečně již od roku 2011. Soubor je s ohledem na literární data relativně velký – soubory pacientů s těžkou akutní pankreatitidou se pohybují do 50ti pacientů z jednoho pracoviště.

Citace k uvedené problematice:

Malina P, Cejp V. Využití interleukinu-6 u těžké akutní pankreatitidy; XXVII. mezikrajské dny klinických biochemiků v Sezimově Ústí, Květen **2008** (přednáška)

Malina P, Cejp V, Jabor A. Využití interleukinu-6 u těžké akutní pankreatitidy; Sborník Sjezdu České společnosti klinické biochemie 20.-22.9.2009, in: Klin Biochem Metab **2009**; 17:195

Malina P, Cejp V, Jabor A. poster „Interleukin-6 jako marker infekce nekrózy u těžké akutní pankreatitidy“ - 1. cena na XIII. Postgraduálním kurzu „Sepse a MODS“, leden **2010**, Ostrava.

Malina P. Těžká akutní pankreatitida - laboratorní monitorování se zaměřením na rozlišení sterilní a infikované nekrózy. XIV. Postgraduální kurz „Sepse a MODS“, leden **2011**, Ostrava.

Malina P, Cejp V, Jabor A. Laboratorní diagnostika akutní pankreatitidy. Sborník Sjezdu České společnosti klinické biochemie 20.-22.9.2009, in: Klin Biochem Metab **2011**; 19:174.

otázka 6.5: Makroamylazémie byla vyloučena paralelním stanovením lipázy, které bylo provedeno u všech pacientů (Písek i Olomouc). CRP bylo stanovováno u všech pacientů.

otázka 6.6: Anamnestická data a komorbidity jsou k dispozici, ale nebyla analyzována. Schválení studie I: Vzhledem k tomu, že se jednalo o retrospektivní analýzu chorobopisů a dat z laboratorního informačního systému, bylo vše schváleno primářem chirurgického oddělení, oddělení klinické biochemie a ředitelem nemocnice Písek.

otázka 6.7: Diskrepance uvedeného počtu CT vyšetření (47 vs. 84) byla způsobena překlepem, všech 84 pacientů mělo provedeno CT vyšetření, 47 z nich bylo mužů.

otázka 6.8: V tabulce 12 u těžké formy AP má být u idiopatické etiologie 6%, chybně je uvedeno 36%.

otázka 6.9: Řada pacientů s lehkou AP měla fibroblastový růstový faktor 21 (FGF-21) v den 1 nad mezí stanovitelnosti a měly nižší průměrný body mass index. Relevantní vysvětlení pro toto nemáme, může jít o protektivní faktor. Obecně obezita zhoršuje průběh AP.

otázka 6.10: Obr. 38 – jde o shodná data, chybění bodů je způsobeno nedokonalostí grafického zobrazení programu MedCalc v korelačním grafu.

otázka 6.11: Tabulka 13: Hodnoty významnosti následující charakteristik (věk, hmotnost, BMI) nebyly uvedeny, protože se jednalo o porovnání laboratorních markerů. Jejich doplnění je uvedeno níže:

Tab. 13. Rozdíly laboratorních charakteristik mezi dvěma skupinami rozdělenými podle klasifikace AP lehká/těžká a uvnitř těchto skupin (porovnání dne 1 a 4)

	Lehká AP	Těžká AP	Významnost p-hodnota
Počet jedinců	70	14	-
Věk roky	58,7 ± 18,2 (45,0 – 73,0)	56,1 ± 15,8 (45,0 – 69,0)	0,589
Hmotnost kg	76,6 ± 14,5 (65,0 – 85,0)	88,6 ± 28,6 (75,0 – 98,0)	0,064
BMI kg·m ⁻²	26,93 ± 5,45 (23,20 – 30,30)	30,40 ± 10,54 (26,00 – 31,50)	0,134

otázka 6.12: Odlišné p-hodnoty u následujících obrázků oproti tabulce jsou způsobeny překlepy u grafů v uvedené hodnotě p: Obr. 59 má být p = 0,005; Obr. 60 má být p = 0,006.

otázka 6.13: Podobně jako u metabolického syndromu jsme zjistili asociaci adiponektinu (ADP) a adipocytárního vazebného proteinu pro mastné kyseliny (A-FABP) jen u mírné AP, u těžké AP jsme prokázali asociaci ADP a FGF21.

otázka 6.14: Absence vztahu závažnost AP vs. A-FABP: Jednalo se o pilotní studii, která nesledovala detailně celý průběh hodnot daného markeru; mezi dnem 1 a 4 klesají všechny 3 adipokiny. Použitím vícenásobné regresní analýzy jsme demonstrovali úzké propojení A-FABP s prokalcitoninem během časně fáze AP bez ohledu na tíži onemocnění. Nicméně A-FABP stejně jako PCT v naší studii během časně fáze AP nekoreloval se závažností onemocnění.

otázka 6.15: U metabolického syndromu byla ve studii prokázána vzájemná pozitivní vazba A-FABP a FGF-21. Hypotéza: zvýšení FGF-21 je kompenzatorní odpovědí na zvýšený metabolický stres reprezentovaný zvýšenými hladinami A-FABP¹. Ve studii Algüla² byla prokázána přítomnost FGF-21 v pankreatu ve vyšších hodnotách než v játrech, tukové tkáni a svalech a zároveň bylo prokázáno jeho protektivní působení proti poškození pankreatu zánětem.

Hypotéza: Pokles hodnot FGF-21 znamená horší prognózu: Může to být způsobeno protektivním působením FGF-21. V naší studii došlo u pacientů s těžkou AP k výraznému poklesu FGF-21 během 4 dnů, zatímco se projevil výrazný nárůst CRP. Podle posledních studií je pravděpodobné, že indukce FGF-21 je omezena na časnou fázi zánětu, na rozdíl od exprese dalších faktorů z rodiny FGF, které jsou produkovány během regenerace pankreatu (např. Algül 2009)². Podle studie Kima (2014)³ FGF-21 působí jako důležitý regulátor adaptace na stres.

Rezistence na FGF-21 byla popsána Fischerem et al. r. (2010)⁴ jakožto vysvětlení příčiny zvýšených hladin FGF-21 u obézních myší. Pro aktivaci signalizace zprostředkované FGF-21 je nutná jeho vazba na FGF-receptor, což je beta-Klotho komplex (Kharitonov 2008). Podle studie Diaz-Delfina et al. (2012) je beta-Klotho zvýšeně exprimován v metabolicky aktivních tkáních (tuková tkáň, játra, pankreas), zánět tukové tkáně u obézních jedinců vede k potlačení exprese beta-Klotho receptorů zprostředkované TNF-alfa a poklesu FGF-21 v adipocytech. Podobný mechanismus může vést k rezistenci na FGF-21 v situacích subklinického zánětu jako je metabolický syndrom, diabetes 2. typu, ICHS (Woo et al. 2013). Tudíž je možné, že A-FABP jakožto klíčový prozánětlivý mediátor spojující obezitu s kardiovaskulárními chorobami se může podílet svým prozánětlivým efektem na mechanismu rezistence na FGF-21.

citace:

¹ Novotny D, Vavrkova H, Karasek D, Lukes J, Slavik L, **Malina P**, Orsag J. Evaluation of total adiponectin, adipocyte fatty acid binding protein and fibroblast growth factor 21 levels in individuals with metabolic syndrome. *Physiol. Res.* 2014; 63: 219-228. IF=1,487

² Algül, H. A Novel Role for the Fibroblast Growth Factor 21 in Acute Pancreatitis. *Gastroenterology*, 2009, 137(5), p.1577-1579.

³ Kim K.H., Lee, M.S. FGF21 as a Stress Hormone: The Roles of FGF21 in Stress Adaptation and the Treatment of Metabolic Diseases. *Diabetes Metab. J.*, 2014, 38, p. 245-251.

⁴ David A. Sarruf, Joshua P. Thaler, Gregory J. Morton, Jonathan German, Jonathan D. Fischer, Kayoko Ogimoto, Michael W. Schwartz: Fibroblast Growth Factor 21 Action in the Brain Increases Energy Expenditure and Insulin Sensitivity in Obese Rats. *Diabetes*. 2010 July; 59(7): 1817–1824.

prof. Palička:

otázka 1: Prokalcitonin jakožto prekurzor kalcitoninu je tvořen v parafolikulárních buňkách štítné žlázy. Tzv. „zánětový“ prokalcitonin (PCT) je tvořen zejména monocyty, makrofágy a neuroendokrinními buňkami. Hepatocyty jako zdroj PCT dosud nebyly spolehlivě potvrzeny, ale původně se předpokládalo, že PCT tvoří.

otázka 2: Nemám, co dodat.

otázka 3: Laboratorní TAT se pohybuje konkrétně na OKB Nemocnice Písek, a.s. u statimových vzorků v následujících relacích: CRP: plazma: cca 30 min, sérum cca 40 min. PCT: cca 45 min, IL-6: cca 45 min. POCT je dostupné pro CRP (kapilární odběr, výsledek do 3 min), PCT (sérum/plazma, kazetky pro semikvantitativní stanovení 4 pásem: < 0.5 ng/ml, ≥ 0.5 ng/ml, ≥ 2 ng/ml, ≥ 10 ng/ml, imunochromatograficky, výsledek do 30 min).

otázka 4: S ohledem na výsledky vlastních studií doporučuji pro predikci tíže AP 4. den stanovit CRP a IL-6. Pro diferenciální diagnostiku sterilní (SN) a infikované nekrózy (IN) 5. – 9. den hospitalizace (popř. i později) stanovit IL-6. Další markery mají data v literatuře, zejm. PCT pro diferenciální diagnostiku sterilní a infikované nekrózy (cut-off 2 ug/l).

Diskuze:

Doc. Vostálová: Uvedl jste, že je důležité rychle rozlišit mezi těžkou a lehkou formou akutní pankreatitidy vzhledem k odlišnému terapeutickému přístupu. Je 4. den hospitalizace pro rozlišení dostatečně včas?

Vzhledem k tomu, že ne vždy je průběh AP determinován již od počátku, kdy AP může probíhat jako lehká forma a v důsledku řady faktorů (např. inadequate terapie) může progredovat do těžké formy (a to často bleskově), je 4. den dostatečný. Navíc terapie je v úvodu velmi podobná až identická – stabilizace oběhu, tekutinová resuscitace, potvrzení diagnózy. Určující je další vývoj, který ve 4. dni již za pomoci laboratorních markerů (CRP, IL-6) lze predikovat.

Prof. Ulrichová: Jaký je vztah životní styl – alkohol – obezita – akutní pankreatitida?

Obezita jako taková jednak zvyšuje riziko rozvoje akutní pankreatitidy, jednak je potvrzeno, že obézní pacienti mají závažnější průběh AP. Alkohol patří k vyvolávajícím faktorům AP, nejčastěji v kombinaci s opulentním jídlem. Dále chronická konzumace alkoholu může vést k rozvoji chronické pankreatitidy. S narůstajícím výskytem obezity zároveň mírně narůstá incidence AP.

Prof. Šimánek: Studie byla provedena ve dvou centrech. Je v nich zajištěn stejný terapeutický postup?

Terapeutické postupy se v obou centrech řídí obecně doporučenými postupy pro léčbu akutní pankreatitidy, které jsou konsenzuální, a nepředpokládáme tedy, že by se významně odlišovaly a to zejména v časně fázi AP (prvních 4-7 dnů AP).

MUDr. Cibiček: Studovali jste vliv používání algoritmu s využitím interleukinu-6 na Vašem pracovišti na mortalitu?

Mortalita na těžkou AP v Nemocnici Písek, kde je algoritmus s IL-6 využíván, patří k nejnižším v ČR v porovnání s publikovanými daty a pohybuje se kolem 6% (v literatuře kolem 9-15%). Nicméně nelze z toho odvozovat, že tato nízká mortalita je v kauzální souvislosti s použitím uvedeného algoritmu, toto jsme nezkoumali.

Prof. Palička - poznámka: Často je těžké rozlišit hned v začátku, zda se jedná o akutní pankreatitidu či exacerbaci chronické pankreatitidy. Většinou jsou to pacienti s řadou komorbidit a jejich potíže i klinický nález může být tímto ovlivněn.

Mgr. Roubalová: Musejí být zvýšeny oba parametry k průkazu těžké AP? (míněno CRP a IL-6)

K predikci těžké AP postačuje zvýšení jednoho z uvedených markerů, nicméně jejich hodnoty jsou vzájemně korelovány a zvyšují se současně. Nicméně, jak vyplynulo z naší studie, pozitivní predikce je problematická (PPV v predikci těžké AP 4. den pro IL-6 byla 29%, pro CRP 39%). Výborná je schopnost uvedených markerů v negativní predikci: NPV 92% pro IL-6 a 96% pro CRP.

Doc. Vacek: Nemůže vést relativně malý počet probandů (studie I: 48 a studie II: 84 pacientů) k zakrytí rozdílů mezi skupinami?

Soubory jsou s ohledem na literární data relativně velké, pacientů s těžkou AP (studie I) je s ohledem na incidenci málo, soubor byl kompletován po dobu 6ti let, pro větší počet probandů by se muselo jednat o multicentrickou studii. 84 pacientů ve studii II je na pilotní studii dostatečný počet, existuje řada renomovaných autorů, kteří demonstrují hodnoty adipokínů v pilotních studiích na 13-20 probandech.

Ing. Novotný - poznámka:

Nadále pokračujeme v náboru probandů a shromažďování dalších vzorků, chystáme se zpracovat den 7 a tím dále sledovat dynamiku uvedených markerů.

Zapsal: MUDr. Pavel Malina, 20.4.2015