



KLINIKA GASTROENTEROLOGII I ZABURZEŃ ODŻYWIANIA

P.O. Kierownik: dr hab. n. med. Maria Kłopocka, prof. UMK

tel./fax: 52 371 49 12, tel. 52 36 55 544, e-mail: gastro@biziel.pl

Szpital Uniwersytecki nr 2 im. dr. Jana Bizuela w Bydgoszczy, ul. Ujejskiego 75 85-168 Bydgoszcz

Dr hab. n. med. Maria Kłopocka, prof. UMK

04. 01. 2020.

Katedra Gastroenterologii i Zaburzeń Odżywiania

Szpital Uniwersytecki nr 2 im dr J. Bizuela

85-168 Bydgoszcz Ujejskiego 75

Rada Naukowa Centrum Onkologii-Instytutu im. Marii Skłodowskiej-Curie w Warszawie

OCENA

Rozprawy doktorskiej magister Agnieszki Bożeny Magdziak na temat:

**„Wartość diagnostyczna oznaczenia wirusa cytomegalii (CMV) w kale u pacjentów z
wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego”**

Promotor: dr hab. n. med. Edyta Zagórowicz

Nieswoiste choroby zapalne jelit, do których zalicza się wrzodziejące zapalenie jelita grubego stanowią grupę przewlekłych, dotychczas nieuleczalnych schorzeń przewodu pokarmowego. Częstość zachorowań w przeciągu ostatnich lat wzrasta, a większość pacjentów to osoby młode, uczące się lub pracujące. Przewlekły przebieg choroby, z okresami rzutów i remisji wpływa na obniżoną jakość życia pacjentów, pociąga za sobą koszty związane z leczeniem i absencją w pracy. Ostatnie kilkanaście lat to istotny postęp w farmakoterapii chorób zapalnych jelit. Poza stosowanymi wcześniej preparatami kwasu 5-aminosalicylowego, steroidami oraz lekami immunosupresyjnymi do leczenia wprowadzane są nowe związki. Od kilkunastu lat w leczeniu ciężkich rzutów wrzodziejącego zapalenia jelita grubego zastosowanie ma infliksymab, przeciwciało monoklonalne skierowane przeciwko prozapalnej cytokinie TNF alfa, kolejno wprowadzane są nowe leki biologiczne. Pomimo istotnego postępu w farmakoterapii, u części pacjentów narastają problemy związane z opornością na wszystkie opcje leczenia zachowawczego oraz występowaniem działań niepożądanych takiego leczenia. Wśród nich dominują infekcje oportunistyczne oraz klinicznie istotne infekcje wirusowe, bakteryjne i grzybicze w wyniku



KLINIKA GASTROENTEROLOGII I ZABURZEŃ ODŻYWIANIA

P.O. Kierownik: dr hab. n. med. Maria Kłopocka, prof. UMK

tel./fax: 52 371 49 12, tel. 52 36 55 544, e-mail: gastro@biziel.pl

Szpital Uniwersytecki nr 2 im. dr. Jana Bizuela w Bydgoszczy, ul. Ujejskiego 75 85-168 Bydgoszcz

uaktywnienia latentnych zakażeń. Osoby ze zmienioną odpowiedzią immunologiczną w wyniku choroby oraz stosowanych leków, które tą odpowiedź modyfikują, są narażone na uczynnienie gruźlicy oraz nowe zachorowania lub reaktywację zakażeń wirusowych i bakteryjnych. Najczęstszą, klinicznie istotną infekcją bakteryjną, jest rzekomobłoniaste zapalenie jelit wywołane zakażeniem *Clostridoides difficile*. Intensyfikacja leczenia wrzodziejącego zapalenia jelita grubego u chorych z rzutem choroby wymaga wykluczenia i ewentualnego leczenia tego zakażenia. Wśród infekcji wirusowych, które nakładają się na rozpoznanie rzutu wrzodziejącego zapalenia jelita grubego są zakażenia adeno i rota-wirusowe oraz zakażenie wirusem cytomegalii (CMV).

Przed intensyfikacją leczenia rzutu wrzodziejącego zapalenia jelita grubego konieczne jest wykluczenie i ewentualne leczenie innych przyczyn zaostrzenia objawów chorobowych, głównie biegunki i wzrostu stężenia wykładników stanu zapalnego (CRP w surowicy krwi, kalprotektyna w stolcu). W codziennej praktyce nie jest to proste. Istnieje kilka metod diagnostycznych wykrywania zakażenia cytomegalowirusem, a wybór testu zależy od sytuacji klinicznej. Zgodnie z aktualnymi zaleceniami, istotne zakażenie CMV (chorobę cytomegalowirusową jelita) należy wykluczyć u pacjentów z ciężkim rzutem wzjg oraz u pacjentów z rzutem opornym na leczenie steroidami i/lub leczenie immunosupresyjne. Standardem w ocenie zakażenia CMV u pacjentów z wzjg jest obecnie badanie immunohistochemiczne wycinków z jelita grubego pobranych podczas endoskopii, jednak wadą tej procedury jest jej inwazyjność i czasochłonność. Metodą pomocniczą, według aktualnych zaleceń, jest ilościowa metoda łańcuchowej reakcji polimerazy (ang. *quantitative polymerase chain reaction* - qPCR) oznaczenia wirusa CMV we krwi/osoczu, ale zgodność między obiema metodami jest umiarkowana i zależy od nasilenia zakażenia. Czutość i swoistość metody PCR w odniesieniu do obecności CMV w tkance okrężnicy jest bardzo wysoka, jednak wynik dodatni nie musi być związany z aktywnym zakażeniem, a jedynie z łagodną reaktywacją lub nawet latentną obecnością CMV w tkance jelita.

Istnieje więc potrzeba dalszych badań w celu opracowania standardu postępowania w diagnostyce choroby cytomegalowirusowej u pacjentów z rzutem wrzodziejącego zapalenia jelita grubego. Ważne jest poszukiwanie skutecznego testu nieinwazyjnego, gdyż



Szpital Uniwersytecki nr 2 im. dr. Jana Bizuela w Bydgoszczy, ul. Ujejskiego 75 85-168 Bydgoszcz

istnieją przeciwwskazania do wykonania pełnej kolonoskopii z pobraniem dużej liczby wycinków u ciężko chorych pacjentów.

Autorka przedstawionej do recenzji pracy doktorskiej zaplanowała prospektywne badanie, w celu sprawdzenia zgodności diagnostycznej metody qPCR (ang. *quantitative polymerase chain reaction* - qPCR) oznaczenia DNA CMV w kale w porównaniu z badaniem wycinków z jelita grubego na obecność antygenu CMV metodą immunohistochemiczną u pacjentów z zaostrzeniem wrzodziejącego zapalenia jelita grubego.

Celem drugorzędowym badania była ocena korelacji między obecnością zakażenia CMV wykazanego jedną i drugą metodą a nasileniem aktywności WZJG.

Należy zaznaczyć, że autorka pracy wprowadziła do praktyki klinicznej metodologię badania qPCR - oznaczenia DNA CMV w kale w swoim miejscu pracy. Jest to nowatorskie podejście do problemu diagnostyki istotnych klinicznie zakażeń CMV oraz próba wyboru najlepszej nieinwazyjnej metody diagnostycznej rozpoznania zakażenia CMV. Oceniając pracę nie sposób wspomnieć, że Klinika Gastroenterologii Onkologicznej COI jest ośrodkiem referencyjnym i opiniotwórczym w zakresie gastroenterologii oraz leczenia nieswoistych chorób zapalnych jelit, dotyczy to również Zakładu Patologii i Diagnostyki Laboratoryjnej COI.

Przedstawiona mi do recenzji praca jest wynikiem ścisłej współpracy klinicystów, mikrobiologów i patomorfologów z tego wiodącego ośrodka. Autorka pracy doktorskiej dokonała analizy danych zebranych przez zespół medyczny, w tej pracy dominujący był aspekt badań mikrobiologicznych w powiązaniu z oceną kliniczną i histopatologiczną aktywności choroby u pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego.

Materiałem do badania był kał, w którym poszukiwano DNA CMV (kopie/ml) metodą PCR oraz wycinki z jelita grubego pobrane w trakcie endoskopii, w których poprzez barwienie swoistymi przeciwciałami poszukiwano antygenu CMV (liczba komórek CMV+/wycinek) oraz oceniono stan zapalny przy pomocy skali Geboesa. Aktywność wzjg oceniano na podstawie skali Mayo, stężenia kalprotektyny w kale i stężenia białka C-reaktywnego w surowicy krwi. Należy podkreślić, że w swojej pracy autorka wykorzystała jedynie dane, które wynikały z procedur diagnostycznych i terapeutycznych, tak więc nie naraziła pacjentów na



Szpital Uniwersytecki nr 2 im. dr. Jana Biziele w Bydgoszczy, ul. Ujejskiego 75 85-168 Bydgoszcz

dodatkowe badania. Stanowi to w pewnym stopniu ograniczenie pracy, gdyż, jak konkluduje autorka, bardziej wartościowe wyniki można byłoby uzyskać wzbogacając badania o oznaczenia CMV metodą PCR w wycinkach z jelita oraz oznaczenia CMV metodą PCR we krwi u wszystkich pacjentów.

Pomimo tych, sygnalizowanych przez autorkę ograniczeń, praca w mojej ocenie jest bardzo wartościowa, nowatorska i wybitna, ponieważ wskazuje na nowe możliwości przede wszystkim nieinwazyjnego wykluczenia, a w części przypadków rozpoznania klinicznie istotnego zakażenia wirusem cytomegalii u pacjentów z rzutem wrzodziejącego zapalenia jelita grubego. Jest to pionierska praca prospektywna, która, po publikacji, będzie niewątpliwie stanowiła znaczący wkład w wypracowywanie standardów postępowania diagnostycznego w chorobie cytomegalowirusowej jelita.

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa posiada typowy, prawidłowy i przejrzysty układ.

We wstępie autorka w sposób wyczerpujący przedstawiła zagadnienia dotyczące cytomegalowirusa. Przedstawiła dane dotyczące taksonomii i budowy wirusa oraz replikacji i latencji. W dalszej części omówiła epidemiologię cytomegalii oraz postacie kliniczne zakażenia. Szczególnie istotne w pracy było omówienie wszystkich obecnie dostępnych metod diagnostycznych infekcji CMV wraz z krytyczną oceną zalet i ograniczeń każdej z metod w różnych sytuacjach klinicznych. W tej części autorka podsumowała aktualny stan wiedzy na temat możliwości diagnostycznych klinicznie istotnej choroby cytomegalowirusowej jelita. Już z tej wstępnej analizy danych literaturowych wynika, że istnieje duża potrzeba kontynuacji badań nad wiarygodnym, czułym, nieinwazyjnym, a równocześnie prostym do wykonania testem diagnostycznym. W zakończeniu tej części wstępu doktorantka omówiła zasady i sposób leczenia pacjentów z wzjg, u których potwierdzono, z dużym prawdopodobieństwem współwystępowanie choroby cytomegalowirusowej jelita. Autorka zwróciła uwagę, że prowadzenie takiego leczenia pozostaje w wielu przypadkach dyskusyjne. Kolejny podrozdział wstępu został poświęcony omówieniu wrzodziejącego zapalenia jelita grubego. Została przedstawiona etiopatogeneza, objawy kliniczne i przebieg choroby, obowiązujące kryteria rozpoznania i oceny aktywności choroby oraz zasady leczenia. Należy podkreślić dużą wiedzę



Szpital Uniwersytecki nr 2 im. dr. Jana Bizuela w Bydgoszczy, ul. Ujejskiego 75 85-168 Bydgoszcz

teoretyczną w tym zakresie, którą ponadto doktorantka przedstawiła w sposób zwarty i zrozumiały. Ostatnia część wstępu poświęcona została kalprotektynie, która w gastroenterologii jest jednym z biomarkerów zapalenia jelita. Podjęcie tego zagadnienia wynikało z przyjętych drugorzędowych celów pracy, a mianowicie oceny korelacji między obecnością zakażenia CMV a klinicznym, endoskopowym, histopatologicznym i laboratoryjnym (stężenie CRP i kalprotektyny w kale) nasileniem aktywności wzjg. Realizacja drugorzędowych celów pracy wydaje się bardzo uzasadniona, gdyż wzbogaca dotychczasowy stan wiedzy zwłaszcza w aspekcie przydatności klinicznej oznaczania poziomu kalprotektyny w stolcu. W chwili obecnej dane literaturowe są nadal nieliczne, podobnie jak dotychczas badane, zróżnicowane pod względem aktywności choroby, grupy pacjentów. W prospektywnym badaniu autorki grupa pacjentów była liczna i dobrze zdefiniowana pod względem aktywności choroby. Uzyskane wyniki w tym zakresie są bardzo wartościowe i, chociaż nie wykazano istotnych korelacji, a doktorantka nie sformułowała w tym zakresie wniosków w pracy, zebrany materiał pozwoli zapewne na przygotowanie wartościowej publikacji.

Głównym celem pracy, jak wspomniano powyżej, było sprawdzenie wartości diagnostycznej nieinwazyjnej metody qPCR oznaczenia DNA CMV w kale w porównaniu ze „złotym standardem”, którym jest metoda immunohistochemiczna badania wycinków z jelita grubego na obecność CMV u pacjentów z rzutem wrzodziejącego zapalenia jelita grubego.

W kolejnej części rozprawy Doktorantka przedstawiła materiał i metodologię prowadzonych badań. Ten rozdział również nie budzi zastrzeżeń, w sposób zrozumiały zostały omówione kryteria włączania pacjentów do badania, jak również zasady wykonywania procedur endoskopowych, histopatologicznych, badania ilościowego PCR CMV w kale oraz oznaczania ilościowego kalprotektyny w kale. Do planowanej analizy wyników zostały dobrane właściwe testy statystyczne.

Badanie uzyskało akceptację Komisji Bioetycznej przy Centrum Medycznym Kształcenia Podyplomowego w Warszawie, a pacjenci, przed włączeniem do badania, zostali poinformowani o jego celu i przebiegu oraz podpisali formularz świadomej zgody na udział



Szpital Uniwersytecki nr 2 im. dr. Jana Biziele w Bydgoszczy, ul. Ujejskiego 75 85-168 Bydgoszcz
w badaniu (wzór formularza został dołączony do pracy).

Rozdział poświęcony omówieniu uzyskanych wyników został opracowany bardzo dobrze, należy podkreślić przydatność właściwie przygotowanych tabel i rycin, które ułatwiają prześledzenie zarówno rezultatów badania, jak i zastosowanej analizy statystycznej. Brakuje, typowego dla tego typu prac zestawienia tabel i rycin w załącznikach pracy, numeracja tabel tradycyjnie jest przedstawiana w liczbach rzymskich, nie uważam jednak, by były to istotne uwagi.

Bardzo ciekawie został napisany rozdział zawierający podsumowanie wyników i dyskusję. Autorka wykazała się dużą wiedzą, umiejętnością doboru literatury (133 pozycje piśmiennictwa), a przede wszystkim krytyczną analizą wyników badań własnych i innych autorów. Przedstawiła zarówno zalety, jak i ograniczenia własnej pracy badawczej. Niewątpliwie jest to pierwsze na świecie badanie prospektywne porównujące dwie metody ilościowego oznaczenia CMV w celu rozpoznania cytomegalowirusowego zapalenia jelita grubego: IHC z wycinków z jelita grubego z PCR z kału w licznej, jednorodnej, dobrze zdefiniowanej grupie pacjentów z wzjg przy zastosowaniu jednorodnej metodologii. Ograniczeniem pracy był przede wszystkim brak oznaczenia CMV metodą PCR w wycinkach z jelita, jednak, jak założono w metodologii, u pacjentów wykonywano tylko takie badania inwazyjne, które były niezbędne w rutynowym postępowaniu diagnostyczno-terapeutycznym.

Autorka sformułowała 3 wnioski, będące odpowiedzią na postawiony w pracy pierwszoplanowy cel badania:

1. Zgodność diagnostyczna oznaczania CMV DNA metodą qPCR w kaleu pacjentów z aktywnym WZJG w porównaniu z CMV IHC w wycinkach z jelita grubego wynosi 74,1%.
2. CMV w kale oznaczony metodą qPCR jest obecny u 2/5 pacjentów z aktywnym WZJG.
3. Negatywny wynik oznaczenia CMV metodą qPCR w kale pomaga wykluczyć chorobę cytomegalowirusową jelita grubego.



KLINIKA GASTROENTEROLOGII I ZABURZEŃ ODŻYWIANIA

P.O. Kierownik: dr hab. n. med. Maria Kłopocka, prof. UMK

tel./fax: 52 371 49 12, tel. 52 36 55 544, e-mail: gastro@biziel.pl

Szpital Uniwersytecki nr 2 im. dr. Jana Biziele w Bydgoszczy, ul. Ujejskiego 75 85-168 Bydgoszcz

Poza wartością naukową, uzyskane wyniki mają duże znaczenie praktyczne. Dotyczy to zwłaszcza wniosku trzeciego, gdyż wykluczenie choroby cytomegalowirusowej jelita grubego testem nieinwazyjnym może ograniczyć ilość inwazyjnych badań endoskopowych i czasochłonnych histopatologicznych, a tym samym zmniejszyć ryzyko działań niepożądanych i obniżyć koszty diagnostyki i hospitalizacji.

Czytając pracę doktorską znalazłam oczywiście drobne błędy. Przede wszystkim uwaga do doktorantki: rozprawa doktorska jest dziełem autorskim, pomimo, iż w przeprowadzenie badań był zaangażowany duży zespół pracowników. Nie należy w związku z tym używać sformułowań „według naszej wiedzy”, „w naszym badaniu”, „przynajemy jednak”, itp. Powinna być stosowana liczba pojedyncza, gdyż analiza uzyskanych wyników i ich omówienie stanowią własną pracę Doktorantki. Sytuacja zmieni się w momencie przygotowywania publikacji przez cały, zaangażowany w badanie zespół, wtedy jak najbardziej znajdzie zastosowanie liczba mnoga. W kilku miejscach we wstępie pracy autorka użyła sformułowania „flora” i „mikroflora jelitowa”. Obecnie obowiązuje określenie „mikrobiota jelitowa”, a błąd wyniknął prawdopodobnie z wykorzystania także starszych pozycji literaturowych, w których stosowane były te nazwy. Podobnie, właściwsze jest określenie „aminotransferazy”, a nie „transaminazy”. Pozycja 120 piśmiennictwa jest anglojęzyczna, a tytuł pracy został podany w języku polskim. Było także kilka drobnych błędów literowych i stylistycznych, ale w żaden sposób nie wpływa to na ogólną ocenę pracy.

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa spełnia wszystkie warunki określone w Ustawie o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki.

Na tej podstawie wnoszę do Rady Naukowej Centrum Onkologii-Instytutu im. Marii Skłodowskiej-Curie w Warszawie o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie magister Agnieszki Bożeny Magdziak do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Wnoszę również o wyróżnienie pracy doktorskiej

Z poważaniem

Maria Kłopocka

dr hab. n. med. Maria Kłopocka
specjalista chorób wewnętrznych
gastroenterolog
8041494