



UNIwersytet Medyczny

IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH WE WROCŁAWIU

Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Analityki Medycznej

Zakład Diagnostyki Laboratoryjnej

Kierownik: **dr hab. Ewa M. Kratz**
tel. 71 784 01 52, e-mail: ewa.kratz@umed.wroc.pl

Wrocław, 01.11.2018 r.

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Pawła Kiszło

pt. „Przydatność diagnostyczna chemokin RANTES i CCL2 w chorobie niedokrwiennej serca”

Przedłożoną do recenzji pracę doktorską wykonano w Zakładzie Laboratoryjnej Diagnostyki Klinicznej Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku. **Promotorem jest dr hab. n. med. Violetta Dymicka-Piekarska, promotor pomocniczy: dr n. med. Olga M. Koper-Lenkiewicz.**

Według danych Eurostatu z 2010 roku, wiodącą przyczyną zgonów na świecie są choroby układu krążenia najczęściej manifestujące się jako zawał serca lub udar mózgu. Związane jest to ze starzeniem się społeczeństwa oraz wzrostem częstości występowania czynników ryzyka, tj. otyłości, nadciśnienia tętniczego, hipercholesterolemii, cukrzycy typu 2, zespołu metabolicznego, małej aktywności fizycznej, palenia tytoniu, nadużywania alkoholu.

Chemokiny, białka należące do rodziny cytokin, aktywnie uczestniczą w różnych etapach formowania się blaszki miażdżycowej. Mają zdolność do adhezji, chemotaksji i aktywacji leukocytów, zarówno *in vitro*, jak i *in vivo*. Ich działanie następuje na skutek pobudzenia specyficznych receptorów powierzchniowych, tzw. receptorów chemokinowych. Spośród znanych chemokin, znaczącą, ale nie do końca poznaną rolę w patomechanizmie powstawania ostrych zespołów wieńcowych, przypisuje się chemokinom RANTES (CCL5, ligand chemokiny z motywem C-C 5) i CCL2 (białko chemotaktyczne monocytów typu 1). RANTES prawdopodobnie uczestniczy w dwóch kluczowych etapach powstawania miażdżycy, tj. chemotaksji leukocytów do ściany naczynia krwionośnego oraz ich migracji z krwi do tkanek. RANTES jest głównie magazynowana w ziarnistościach α płytek krwi, a podczas ich aktywacji zostaje uwolniona do osocza i „osadzona” na powierzchni uszkodzonego lub aktywowanego śródbłonnka naczyń, gdzie pełni swoją funkcję biologiczną. CCL2 natomiast jest zaangażowana w rekrutację monocytów/makrofagów do miejsca zapalenia, poprzez uwalnianie monocytów ze szpiku, a następnie wytwarzanie gradientu glikokaliksu śródbłonnka naczyniowego dla monocytów w miejscu toczącego się stanu zapalnego.

W kontekście tych informacji dochodzimy do celu niniejszej rozprawy doktorskiej. Przedmiotem dysertacji Pana mgr Pawła Kiszto były badania ukierunkowane na ocenę przydatności diagnostycznej obydwu chemokin, jako wskaźników rozwoju zmian miażdżycowych w chorobie niedokrwiennej serca. Wyróżniono następujące cele szczegółowe: **1)** Ocena stężenia RANTES i CCL2 w grupie chorych z ostrym zespołem wieńcowym (zawał serca z uniesieniem załamka ST w badaniu EKG, STEMI) i porównanie ich z wynikami otrzymanymi dla chorych ze stabilną chorobą wieńcową oraz dla grupy osób zdrowych; **2)** ocena korelacji między RANTES i CCL2 a markerem stanu zapalnego – hsCRP oraz liczbą białych krwinek, liczbą płytek krwi i ich średnią objętością, a także klasycznymi czynnikami ryzyka rozwoju miażdżycy (wiekiem i płcią pacjentów oraz występowaniem nadciśnienia, otyłości, dyslipidemii i cukrzycy); **3)** analiza regresji liniowej jedno- i wieloczynnikowej dla chemokin RANTES i CCL2; **4)** ocena zależności między wartościami stężeń RANTES i CCL2 a liczbą zajętych miażdżycą tętnic wieńcowych; **5)** ocena przydatności diagnostycznej badanych chemokin poprzez ocenę wielkości powierzchni pola pod krzywą ROC, wyznaczenie czułości i swoistości diagnostycznej oraz wartości predykcyjnej dodatniej i ujemnej.

Badania objęły 84 pacjentów z ostrym zespołem wieńcowym, których podzielono na dwie podgrupy: STEMI i NSTEMI (zawał serca bez uniesienia załamka ST w badaniu EKG) oraz 33 chorych ze stabilną chorobą wieńcową, hospitalizowanych i diagnozowanych w Klinice Kardiologii i Kardiochirurgii Uniwersyteckiego Szpitala Klinicznego w Białymstoku w latach 2015-2017. Jako kryteria włączenia do grupy badanej uznano: **1)** wiek pacjenta między 18-80 rokiem życia, **2)** obecność w koronarografii istotnego zwężenia tętnicy wieńcowej (zwężenie światła naczynia >50%), **3)** ocenę funkcji skurczowej lewej komory w przekłatkowym badaniu echokardiograficznym. Do badań nie włączono pacjentów z ostrą lewokomorową niewydolnością serca, obrzękiem płuc, ciężką niewydolnością serca, obrzękiem płuc, ciężką niewydolnością nerek, wstrząsem kardiogennym oraz świeżym udarem mózgu. Grupa badana obejmowała także pacjentów ze stabilną chorobą wieńcową, która została potwierdzona w badaniu angiograficznym. Grupa kontrolna obejmowała 21 zdrowych osób, pod względem wieku i płci zbliżonych do grupy badanej, którzy byli poddawane okresowym badaniom w Poradni Medycyny Pracy Uniwersyteckiego Szpitala Klinicznego w Białymstoku, bez epizodów sercowo-naczyniowych, cukrzycy i nadciśnienia w historii choroby. Kryteriami wykluczającymi dla grupy kontrolnej były: infekcje, stany zapalne, choroby ogólnoustrojowe i niewydolność nerek. Pacjenci nie przyjmowali leków przeciwzapalnych ani żadnych leków przeciwplatekcyjnych w ciągu ostatnich 7-10 dni.

Stężenie chemokin RANTES i CCL2 oznaczano w osoczu ubogopłytkowym z wykorzystaniem immunoenzymatycznego testu fazy stałej ELISA (R&D Systems). Materiałem do badań była krew żylna pobierana w momencie przyjęcia pacjenta do szpitala, przed rewaskularyzacją wieńcową. Uzyskane wyniki poddano wnikliwej analizie statystycznej. Dla cech mierzalnych wyliczono medianę, minimum, maksimum i interkwartykile, a dla cech jakościowych obliczono ich rozkład ilościowo-procentowy. Do oceny normalności rozkładu badanych cech wykorzystano test Shapiro-Wilka. Z uwagi na brak normalności rozkładu, przy porównaniach między dwiema grupami stosowano test U Manna-Whitneya, natomiast do porównań większej liczby grup stosowano odpowiednio analizę wariancji lub test Kruskala-Wallisa. Do porównań cech jakościowych stosowano test niezależności chi-kwadrat, a występowanie korelacji między badanymi parametrami zbadano testem Spearman'a. Wykonano także analizę krzywej ROC, gdyż najważniejszym wskaźnikiem, który świadczy o przydatności klinicznej danego parametru jako markera choroby jest ocena mocy diagnostycznej, której wykładnikiem jest powierzchnia pola pod krzywą ROC - im większa powierzchnia pola, tym wyższa moc diagnostyczna.

Dla RANTES i CCL2 przeprowadzono także analizę regresji liniowej jednoczynnikowej i wieloczynnikowej u chorych na choroby sercowo-naczyniowe.

Praca doktorska ma typowy układ edytorski, z zachowaniem właściwych proporcji między poszczególnymi rozdziałami. Dysertacja jest przejrzysta, opatrzona wieloma ładnie wykonanymi rysunkami i tabelami. Piśmiennictwo Doktorant dobrał umiejętnie (aż 211 pozycji), z czego, co warto podkreślić, tylko 6 stanowiły prace polskojęzyczne, a 19% stanowiły publikacje z lat 2009-2018.

We „Wstępie” Doktorant w sposób przejrzysty przedstawił wszystkie niezbędne informacje, które dają podwaliny teoretyczne i pozwalają zarówno na zrozumienie badanego zagadnienia, jak również celowości podjętych badań oraz uzasadniają konieczność wytypowania nowych biomarkerów procesów zapalnych i miażdżycowych, wraz z oceną ich przydatności diagnostycznej jako wskaźników rozwoju zmian miażdżycowych w chorobie niedokrwiennej serca. Uzyskane wyniki badań przedstawiono w sposób jasny i zrozumiały, a liczne zastosowane metody analizy statystycznej dobrano prawidłowo. W rozdziale „Dyskusja” zawarty jest wiele cennych informacji ogólnych, które pozwalają na zrozumienie tematyki badawczej jaką zajmował się Doktorant, a dyskusja nad otrzymanymi wynikami podkreśla nowatorstwo i wagę jaką tego typu oznaczenia mogą mieć w diagnostyce laboratoryjnej zmian miażdżycowych w chorobie niedokrwiennej serca. Wnioski sformułowano prawidłowo.

Przedstawiona do recenzji praca jest nowatorska, bardzo wartościowa pod względem naukowym i wnosi szereg nowych informacji, interesujących zarówno dla klinicystów, jak i diagnostów laboratoryjnych. Doktorant nie ustrzegł się drobnych niedociągnięć, które jednak nie umniejszają wartości merytorycznej przedstawionej do recenzji dysertacji. Z uwagi na to, że zwrócenie na nie uwagi może stanowić pomoc przy przygotowywaniu przyszłych opracowań naukowych, pozwolę sobie najważniejsze z nich wymienić:

- w tekście niejednokrotnie używane są skróty zarówno nazw angielskich, jak i polskich, których znaczenie nie jest wyjaśniane po ich pierwszym użyciu w tekście. Niektóre z nich nie są nawet wyjaśnione w „Wykazie skrótów” (np. PPCI, ABCA1 transpoter, PAI1, PMV, PCT). W moim odczuciu wszystkie używane skróty powinny mieć swoje wyjaśnienie w tekście pracy, niezależnie od tego, czy są one wyjaśnione w „Wykazie używanych skrótów”;
- opisy na wszystkich rycinach powinny być po polsku, nie po angielsku (ryc. 2, 5, 7, 9);
- str. 12: LDL to Low-Density Lipoprotein (lipoproteina o niskiej gęstości), a nie „małe gęste LDL”;
- str. 16: zwrot „cząsteczki węglowodorowe sialyl-Lewis X” jest niepoprawny. Powinno być: „cząsteczki węglowodanowe (lub oligosacharydowe) sialo-Lewis X”;
- str. 17, tabela 1: jest „sialylowane glikoproteiny”, a powinno być: „sialowane glikoproteiny”, co jest powszechnie stosowanym pojęciem w glikobiologii. Ponadto wszystkie używane w tabeli skróty powinny być pod nią wyjaśnione, tak aby tabela i opis do niej stanowiły całość, bez konieczności sięgania do tekstu;
- str. 20: zdanie „Z kolei integryny z klasy $\beta 1$ wykazują ekspresję na komórkach mięśni gładkich, uczestniczą w ich przyłączaniu do macierzy zewnątrzkomórkowej i umożliwienie fenotypu skurczowego tych komórek” jest niezrozumiałe. Proszę o wytłumaczenie;
- angielsko brzmiące słowo „ekstrawazacja” powinno być zastąpione słowem „wynaczynienie”, a słowo „transmigracja” słowem „przechodzenie”, zaś zamiast słów „proteiny” i „N-terminalny” powinny być używane słowa „białka” i „N-końcowy”. Także słowo „poziom” w odniesieniu do

stężenia danej substancji jest zapożyczeniem z angielskiego, a „molekuła” to po polsku „cząsteczka”;

- w tabeli 2 są użyte różne punktory przy wymienianiu ligandów dla chemokin. Czym jest to spowodowane? Proszę o wytłumaczenie;
- str. 27: fragment od wiersza 1 do 10 jest identyczny jak na str. 25, wiersze 6-15;
- Powinno się używać nazwy „glukozaaminoglikany”, a nie „glikozaminoglikany”;
- str. 52: rysunek bez numeru i podpisu. Słowo „śmieci” można by zastąpić słowem „zanieczyszczenia”. Skrót PCT powinien być wyjaśniony;
- mówimy o liczbie pacjentów, naczyń krwionośnych, a nie o ich ilości;
- definicja czułości diagnostycznej jest niepoprawna stylistycznie, przez co nie do końca klarowna, a podany wzór do obliczenia czułości diagnostycznej jest błędny i tożsamy ze wzorem do obliczenia swoistości diagnostycznej;
- str. 59: „W grupie z OZW mediana stężenia RANTES była prawie 3-krotnie **niższa**,...” . Brakuje słowa „niższa”;
- w opisach do tabel, powinny być używane polskie nazwy, a wyjaśnienie/rozwińnięcie angielskich skrótów powinno ewentualnie być podane w nawiasie jako dodatkowa informacja (np. tabela 7, 8, 9, 10);
- różnice między badanymi grupami się obserwuje, a nie uzyskuje;
- mówi się o tym, że np. różnice między grupami są „istotne statystycznie”, a nie „istotnie statystycznie” i tak np. „analiza wartości stężeń danego parametru nie wykazała istnienia różnic istotnych statystycznie między grupami”, nie zaś „stężenia nie różniły się istotnie statystycznie między grupami”;
- W streszczeniu w wersji anglojęzycznej odnośnie różnic istotnych statystycznie powinno się używać zwrotu np. „significantly higher”, a nie „statistically significantly higher”, gdyż już samo określenie „significantly” oznacza, że obserwowane różnice w wartościach analizowanego parametru między badanymi grupami są statystycznie istotne.
- W pracy znalazły się ponadto nieliczne literówki, skróty myślowe, niezręczności językowe, błędy stylistyczne i interpunkcyjne, co jednak nie przeszkadza w zrozumieniu sensu przedstawianych treści i nie wpływa na wartość merytoryczną pracy.

Podsumowując stwierdzam, że Doktorant umiejętnie zorganizował swój warsztat badawczy, wykazał się dużą pracowitością i starannością w opracowaniu uzyskanych wyników, wykonał i przeanalizował bardzo wiele oznaczeń, co pozwoliło na osiągnięcie wszystkich zakładanych celów. Przeprowadzone badania są wartościowe i dały podstawę do wyciągnięcia siedmiu najważniejszych wniosków: **1)** wykazano, że wartości stężeń RANTES i CCL2 są wyższe, a różnice są istotne statystycznie, zarówno u pacjentów z zawałem mięśnia sercowego, jak i stabilną chorobą wieńcową, w porównaniu do osób zdrowych, co może wskazywać na zaangażowanie tych cząsteczek w powstawanie procesu miażdżycowego; **2)** badane chemokiny można uznać za potencjalne wskaźniki przewlekłego stanu zapalnego, co mogą potwierdzać obserwowane wyższe wartości stężeń RANTES i CCL2 u pacjentów ze stabilną chorobą wieńcową w porównaniu do pacjentów z zawałem serca; **3)** w chorobie sercowo-naczyniowej lepszym wykładnikiem procesu miażdżycowego jest RANTES, co jest związane z jej większym wydzielaniem; **4)** ocena stężenia RANTES i CCL2 może być pomocna w stwierdzeniu obecności zmiany miażdżycowej, ale nie jej nasilenia; **5)** obserwowana korelacja między wartościami stężeń chemokiny RANTES i średnią objętością płytek krwi (MPV) może potwierdzać jej pochodzenie

z płytek krwi i świadczyć o zwiększonej aktywacji płytek krwi u pacjentów z chorobą sercowo-naczyniową; **6)** w modelu analizy regresji liniowej wieloczynnikowej wykazano, że płeć, wartość MPV oraz stężenie CCL2 są zmiennymi predykcyjnymi wpływającymi na stężenie RANTES; **7)** RANTES, obok hsCRP, może być użytecznym wskaźnikiem procesu miażdżycowego i towarzyszącego mu stanu zapalnego u pacjentów z chorobą sercowo-naczyniową, na co wskazuje wykazana wysoka moc diagnostyczna oraz czułość i swoistość diagnostyczna.

Uważam, że recenzowana przeze mnie rozprawa doktorska całkowicie spełnia wymagania ustawy o stopniach naukowych i przedstawiam Radzie Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku wniosek o dopuszczenie Pana mgr Pawła Kiszło do dalszych etapów przewodu doktorskiego oraz wnioskuję o przyznanie za niniejszą dysertację nagrody JM Rektora Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku.

Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu
ZAKŁAD
DIAGNOSTYKI LABORATORYJNEJ
kierownik

dr hab. Ewa M. Kratz

