

Poznań, 22 listopada 2018 roku

Dr hab. n. med. Ewa Wysocka
Katedra i Zakład Diagnostyki Laboratoryjnej
Wydział Lekarski I
Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego
w Poznaniu

Recenzja

rozprawy przygotowanej na stopień doktora nauk medycznych przez mgr Pawła Kiszło

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

Promotor: dr hab. n. med. Violetta Dymicka-Piekarska

Uniwersytet Medyczny w Białymstoku
Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej

Choroby sercowo-naczyniowe (ChSN) stanowią niesłabnące wyzwanie diagnostyczne współczesnej medycyny. Według raportów Głównego Urzędu Statystycznego od około 10 lat utrzymuje się blisko 46% udział przyczyn sercowo-naczyniowych (główna przyczyna) w ogólnej liczbie zgonów w Polsce. Spośród chorób układu krążenia, w Polsce podobnie jak i w Europie, największa liczba zgonów jest spowodowana chorobą niedokrwinną serca (23%), na drugim miejscu – chorobą naczyń mózgowych (18%). Wielowątkowa definicja miażdżycy uniemożliwia (na obecnym etapie wiedzy) wybór pojedynczego czynnika ryzyka rozwoju ChSN. Natomiast w kontekście powikłań miażdżycy i różnych postaci choroby niedokrwiennej serca, szczególnego znaczenia nabiera możliwość potwierdzenia/wykluczenia ostrych zespołów wieńcowych np. przy użyciu parametru biochemicznego - biomarkera.

Pan mgr Paweł Kiszło podjął temat zapalenia w patobiochemii miażdżycy i jej powikłań oraz oceny chemokin RANTES i CCL2 w chorobie niedokrwiennej serca, w tym u pacjentów z ostrym zespołem wieńcowym i stabilną chorobą wieńcową, w odniesieniu do osób bez rozpoznania tej choroby. Efekty jego pracy są cennym elementem pogłębienia wiedzy dotyczącej patobiochemii oraz roli medycyny laboratoryjnej w diagnostyce ww. stanów klinicznych.

Rozprawa doktorska składa się z części, uporządkowanych według przewidzianych standardów. Praca liczy 128 stron, o typowym dla rozprawy doktorskiej układzie, który obejmuje: spis treści, wykaz skrótów, wstęp, cel pracy, materiał i metody, wyniki, dyskusję, wnioski, streszczenie w języku polskim i angielskim, piśmiennictwo, wykaz tabel i rycin.

Praca napisana jest poprawną polszczyzną. Niewielkie błędy edytorskie (pojedyncze skróty np. PPCI, CRP, nie zostały wyjaśnione w tekście ani w wykazie skrótów, ryciny 1, 5, 9 nie znalazły odniesienia w tekście, powtórzono 10-wersowy akapit kończący rozdział 1.7.1) nie obniżają bardzo dobrego odbioru pracy.

Autor opisuje chorobę niedokrwienną serca poczynając od epidemiologii, poprzez aspekty kliniczne do procesów biochemicznych leżących u podstaw rozwoju blaszki miażdżycowej. Ze względu na wielowątkowość współczesnej definicji miażdżycy, należy podkreślić przejrzystość omawianych zagadnień. Doktorant precyzyjnie przedstawia mechanizmy wczesnego etapu tworzenia blaszki miażdżycowej. Zwraca uwagę przemyślane, uporządkowane omówienie szczegółowych biochemicznych interakcji komórek krwi, śródbłonna i różnych molekuł adhezyjnych wraz z ligandami, tj. selektyn, integryn, cząsteczek immunoglobulino-podobnych, i w konsekwencji wskazanie roli chemotaktycznych cytokin (chemokin). Autor wyczerpująco uzasadnia wybór chemokin RANTES i CCL2 (MCP-1) na przedmiot swoich badań, w aspekcie aktualnych wyników prac eksperymentalnych dotyczących zawału mięśnia sercowego oraz potencjalnych korzyści klinicznych płynących ze znajomości patomechanizmów niedokrwienia, martwicy i regeneracji *myocardium*.

Syntetyczne przypomnienie kluczowych informacji poprzedza prezentację celu pracy i pięciu celów szczegółowych. Badania podjęto dla oceny przydatności diagnostycznej chemokin RANTES i CCL2 jako wskaźników rozwoju zmian miażdżycowych w chorobie niedokrwiennej serca (ChNS). Kolejnymi celami były: ocena stężenia ww. chemokin z uwzględnieniem postaci klinicznej ChNS; czynników ryzyka sercowo-naczyniowego, w tym laboratoryjnych wykładników stanu zapalnego; wyników badania koronarograficznego oraz analiza wartości diagnostycznej ocenianych chemokin.

W rozdziale „Materiał i Metody” Doktorant zamieszcza numer uchwały Komisji Bioetycznej UMB akceptującej protokół badania. Autor szczegółowo charakteryzuje pacjentów z chorobą niedokrwienną serca wraz z opisem kryteriów włączenia i wyłączenia do grup badanych. Grupę kontrolną stanowiło 21 osób zdrowych, dla których umieszczono opisową informację o braku czynników ryzyka sercowo-naczyniowego. Z obowiązku recenzenta zwracam uwagę, że przedstawiona w tym rozdziale liczba 84 pacjentów z ostrym zespołem wieńcowym (OZW) i 33 pacjentów ze stabilną chorobą wieńcową, w rozdziale „Wyniki” zmniejsza się odpowiednio do 83 i 32, pozostając konsekwentnie w kolejnych analizach statystycznych, w tym w ramach OZW: 38 osób STEMI i 45 osób NSTEMI. Metodologia zastosowana w pracy jest poprawna i dobór metod analitycznych był właściwy. Doktorant wnikliwie omawia metody badawcze zastosowane dla oceny stężenia chemokin. Zauważyłam drobne nieścisłości: w wykazie sprzętu wykorzystywanego podczas oznaczeń Autor wymienił inny czytnik mikropłytek niż bezpośrednio w metodyce oznaczenia, podobnie - opis próbki osocza przygotowanej do oceny stężenia każdej z chemokin nieco różni się w podrozdziałach 3.3. i 3.6.1. Dla metod pomiaru stężenia RANTES i CCL2 nie zamieszczono współczynników zmienności. Dane dotyczące dokładności i precyzji metody charakteryzują wartość uzyskanych wyników i mogłyby umocnić ich kliniczne znaczenie. W podrozdziale 3.8. „Wskaźniki diagnostyczne”, wzory będące podstawą wyznaczania czułości i swoistości diagnostycznej nie różnią się między sobą, jednakże prawidłowa definicja i opis skrótów w legendzie, pozwalają traktować to jako błąd edytorski.

Doktorant przeprowadził analizę statystyczną wyników przy zastosowaniu właściwych metod. Efekty opracował w formie przejrzystych tabel i wykresów. W omówieniu wyników analiz statystycznych

wkładało się określenie odwrotne: wartość MPV wyższa (na wykresie - niższa) u chorych z OZW w odniesieniu do pacjentów ze stabilną chorobą wieńcową.

W analizie regresji liniowej jednoczynnikowej, Doktorant przedstawia m.in. zastosowane leki (str.75), jednocześnie te same leki wymienia jako podane w momencie przyjęcia (Tabela 3) oraz odnotowuje, że krew żylną do badań pobierano w momencie przyjęcia (str.44) – czy wobec tego można analizować wpływ zastosowanego leczenia?

Sposób przedstawienia wyników w podrozdziale 4.5. "Ocena wskaźników diagnostycznych", spowodował kilka uwag. Ocena poszczególnych elementów analizy krzywej ROC - oddzielnie, jest trudna. Analiza ta docelowo służy zaproponowaniu najsilniejszego testu diagnostycznego, który przy wyznaczonej wartości odcięcia, z określoną czułością i swoistością, będzie różnicował dwa stany kliniczne. W związku z tym, wartość odcięcia (*cut-off*) z reguły umieszcza się wraz z odnoszącymi się do niej czułością i swoistością, wskazując przy tym wartość pola pod krzywą (AUC) opisującą siłę/moc testu.

Omawiając wyniki analizy krzywych ROC zawartych w Tabeli 10, Autor przedstawił RANTES jako parametr o najwyższej czułości, podczas gdy parametry analizy ROC w tabeli wskazują na hsCRP.

Po przeprowadzeniu porównania wartości MPV we wszystkich badanych grupach (tabele i ryciny), zastanawia przyjęcie przez Doktoranta wartości odcięcia 7,0 fl przy różnicowaniu STEMI i grupy kontrolnej oraz 7,8 fl przy różnicowaniu NSTEMI i grupy kontrolnej, dla ustalenia czułości i swoistości diagnostycznej.

W opracowaniu analizy krzywych ROC zostały umieszczone wartości predykcyjne, dodatnia (PPV) i ujemna (NPV) – czy Autor wyznaczał je zgodnie ze wzorami zamieszczonymi w rozdziale „Materiał i Metody” i czy uwzględniał częstość występowania choroby?

Doktorant podjął się trudu interpretacji wyników uzyskanych różnymi testami statystycznymi. W prowadzonej dyskusji nawiązał dialog kliniczno-laboratoryjny, konsekwentnie zmierzając do wyciągnięcia syntetycznych wniosków. W przeprowadzonej dyskusji Autor starał się uwzględnić wpływ różnych czynników ryzyka miażdżycy, dostępnych w praktyce klinicznej, na uzyskane wartości stężeń RANTES i CCL2. Autor wykazał się konsekwencją i przedstawione we wstępie interakcje cytokin z komórkami krwi wykorzystał do konfrontacji rezultatów swoich badań z wynikami innych badaczy. Na uwagę zasługuje dyskusja dotycząca stężenia chemokin we krwi w zależności od wyniku badania koronarograficznego, tj. ilości naczyń wieńcowych zajętych procesem patologicznym, utożsamianej z zaawansowaniem procesu miażdżycowego. Z pewnością w kolejnych badaniach należałoby uwzględnić leczenie stosowane przez pacjentów w stabilnym okresie choroby. Dodatkowo, przedstawione przez Doktoranta dane mogą sugerować odmienny metabolizm RANTES i CCL2, zwłaszcza w ostrych zespołach wieńcowych i stabilnej chorobie wieńcowej.

Autor potwierdza, że w literaturze brakuje danych na temat przydatności diagnostycznej chemokin RANTES i CCL2 w różnych postaciach klinicznych choroby niedokrwiennej serca. W opinii recenzenta, Doktorant w swojej pracy wskazuje kierunek kontynuowania badań w przedstawionych grupach chorych oraz potrzebę badań prospektywnych, zwłaszcza dla oceny chemokin RANTES i CCL2 jako czynników

prognostycznych dla pozawałowych powikłań, m.in. niewydolności krążenia i śmiertelności. Poznanie przez Doktoranta warsztatu analiz statystycznych, uzyskane wyniki oraz włączenie do dyskusji zagadnień dotyczących znaczenia prognostycznego parametrów, powinny zachęcić Doktoranta do kontynuowania pracy badawczej.

Wnioski rozprawy doktorskiej zostały poprawnie sformułowane i odpowiadają postawionym celom. Nowością pracy jest przedstawienie wartości diagnostycznej chemokin RANTES i CCL2 w procesie różnicowania klinicznych postaci choroby niedokrwiennej serca.

Zebrane 211 pozycji piśmiennictwa zawierają istotne prace z obszaru badanego przez Doktoranta i w 9% pochodzą z ostatnich 5 lat, w 12% z lat 2008-2012, w 45% z lat 2000-2007 i w około 34% z ostatniej dekady XX wieku.

Podsumowując, przedłożona do recenzji rozprawa doktorska wpisuje się w nurt poszukiwań biomarkerów chorób sercowo-naczyniowych, zwłaszcza ostrych zespołów wieńcowych, ukazując zdobycze biochemii w dialogu kliniczno-laboratoryjnym. Doktorant wykazał się znajomością wyzwań współczesnej diagnostyki choroby niedokrwiennej serca, posłużył się nowoczesnym warsztatem badawczym, w tym różnorodnymi testami statystycznymi i zrealizował założone cele. Przedstawione wyniki badań pogłębiają naszą wiedzę o patobiochemii miażdżycy i podnoszą znaczenie medycyny laboratoryjnej w praktyce klinicznej.

Stwierdzam, że praca mgr Pawła Kiszło spełnia warunki określone w art. 13 *Ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki z dnia 14 marca 2003 r.* (Dz. U. z 2016 r. poz. 882). Wnoszę do Wysokiej Rady Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku, o dopuszczenie mgr Pawła Kiszło do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Kierownik
Katedry i Zakładu Diagnostyki Laboratoryjnej
Ewa Wysocka
dr hab. n. med. Ewa Wysocka