

Poznań, 14 lutego 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 Karinę Lipartowską-Klimuk
pt. Izoformy transferyny w chorobach trzustki

Promotor: dr hab. n. med. Bogdan Cyłwik
Uniwersytet Medyczny w Białymstoku
Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej

Choroby trzustki nadal stanowią wyzwanie diagnostyczne współczesnej medycyny. Jednym z możliwych scenariuszy patologicznych jest sekwencja: ostre zapalenie – przewlekłe zapalenie – nowotwór trzustki. Diagnostyka ostrego zapalenia trzustki jest najlepiej opracowaną spośród wymienionych i składa się m.in. ze schematu badań laboratoryjnych, których wyniki służą rozpoznawaniu tej patologii. Przewlekłe zapalenie trzustki, a zwłaszcza rozwój procesu nowotworowego w trzustce należą do trudnych diagnostycznie przedsięwzięć. Krajowy Rejestr Nowotworów w ostatniej publikacji za 2015 r. podaje, że nowotwory trzustki (C25) w strukturze zachorowań stanowiły 2,2% u każdej płci oraz w strukturze zgonów 5,4% u kobiet i 4,4% u mężczyzn. Nowotwory trzustki zajmują co prawda 13-te (kobiety) i 10-te (mężczyźni) miejsce wśród rozpoznanych w 2015 roku, ale należą do nowotworów, których tzw. surowy współczynnik zachorowalności uległ prawie dwukrotnemu zwiększeniu od 1980 roku u obu płci oraz dla którego 1-roczny wskaźnik przeżycia od lat utrzymuje się około 22% i 5-letni wskaźnik przeżycia około 8%.

Każda propozycja biomarkerów jest przyjmowana z nadzieją na zastosowanie w praktyce klinicznej. Podjęty przez Panią mgr Karinę Lipartowską-Klimuk temat dotyczący oceny izoform transferyny w chorobach trzustki jest cennym elementem pogłębienia wiedzy dotyczącej patobiochemii oraz roli medycyny laboratoryjnej w diagnostyce i monitorowaniu tych chorób.

Rozprawa doktorska składa się z części, uporządkowanych według przewidzianych standardów. Praca liczy 160 stron, o typowym dla rozprawy doktorskiej układzie, na który składają się: spis treści, wykaz skrótów, wstęp, cel pracy, materiał i metody, wyniki badań, dyskusja, wnioski, streszczenie w języku polskim i angielskim, piśmiennictwo, wykaz tabel i rycin oraz kopia zgody komisji bioetycznej. Praca napisana jest poprawną polszczyzną z dużą dbałością o przestrzeganie reguł gramatycznych i stylistycznych. Wyjaśnienie skrótu klasyfikacji zaawansowania procesu nowotworowego TNM (prawidłowo: T – tumor, N – node, M – metastasis) w przedłożonej pracy, jako N – *nodules* i M – *modules*, traktuję jako pomyłkę edytorską.

Autorka w sposób modelowy, rozpoczynając od budowy i funkcji trzustki oraz klasyfikacji chorób tego narządu, poprzez obowiązujące standardy diagnostyczne, przeszła do trudnych zagadnień biochemicznych. Umiejętnie omówiła proces glikozylacji białek i jego znaczenie dla funkcji glikoprotein. Przedstawiła szczegóły biochemiczne warunkujące mikroheterogenność transferyny oraz dotychczas udokumentowane zmiany profilu glikoform tego białka w różnych stanach klinicznych. Autorka wnikliwie przeanalizowała aspekty kliniczno-laboratoryjne zmian we wzorze glikozylacji transferyny poczynawszy od wrodzonych zaburzeń glikozylacji białek, poprzez udział czynników zewnętrznych (np. nadużywanie alkoholu), do zaburzenia glikozylacji białek osocza krwi w chorobach trzustki. Sposób przedstawienia zagadnienia glikozylacji wskazuje na gruntowną znajomość tematu i umiejętność wybrania informacji kluczowych dla zrozumienia podstaw i celu ocenianej pracy.

Biochemiczne zagadnienia zostały dodatkowo syntetycznie przedstawione w celu pracy, dla lepszego zaprezentowania czterech celów szczegółowych. Badania podjęto w celu oceny zmian stężenia transferyny oraz zmian profilu izoform transferyny w surowicy pacjentów z ostrym i przewlekłym zapaleniem trzustki oraz pierwotnym nowotworem trzustki, z uwzględnieniem klasyfikacji TNM. Kolejnymi celami były: analiza korelacji zmian profilu izoform z wynikami badań biochemicznych, które posłużyły charakterystyce pacjentów oraz ocena mocy diagnostycznej wyników oznaczeń transferyny i jej izoform w chorobach trzustki.

W rozdziale „Materiał i metody” Autorka szczegółowo charakteryzuje grupy badane oraz wnikliwie omawia zastosowane metody badawcze. Badaniami objęto 143 osoby: 38 pacjentów z ostrym zapaleniem trzustki, 32 chorych z przewlekłym zapaleniem trzustki, 43 pacjentów z pierwotnym nowotworem trzustki i 30 osób zdrowych. Metodologia zastosowana w pracy jest poprawna i dobór metod analitycznych był właściwy.

Podrozdział „Oznaczanie stężenia izoform transferyny” sprowokował kilka uwag. Tytuł podrozdziału oraz stwierdzenie, że „Aparat oblicza względne stężenie (%) każdej z izoform” – wydają się być użyte pochopnie. Aparat na podstawie rozdziału elektroforetycznego podaje wzór odsetkowy pięciu izoform: penta-, tetra-, tri-, di- i a-sjalotransferyny. Stężenie każdej izoformy można oszacować w pośredni sposób, tj. obliczyć na podstawie stężenia całkowitego transferyny (w pracy pomiar metodą immunonefelometryczną) i elektroforetycznego wzoru odsetkowego oraz wyrazić w „g/l”. W porównaniu z cytowanymi oryginalnymi pracami, w odniesieniu do ocenianych glikoform transferyny, właściwym określeniem wydaje się być wzór odsetkowy, profil izoform itp. – określenia, których Doktorantka użyła we wstępie i powinny być kontynuowane w kolejnych częściach rozprawy doktorskiej.

Wyniki, uzyskane po zastosowaniu właściwych metod statystycznych, Doktorantka starannie opracowała. Przejrzyste tabele i wykresy ułatwiają śledzenie wypowiedzi Autorki. Zastosowana metoda elektroforezy kapilarnej umożliwia rozpoznanie pięciu konkretnych izoform transferyny. W wynikach odnajdujemy wzór odsetkowy dla penta-, tetra-, tri- i di-sjalotransferyny. Jeżeli u żadnego pacjenta oraz w grupie kontrolnej, nie znaleziono asjalotransferyny, to powinno to zostać odnotowane. Realizacja jednego z celów pracy – analiza stężenia transferyny i profilu jej izoform w dwóch grupach pacjentów:

z przewlekłym zapaleniem trzustki i nowotworem trzustki – dostarczyła ważnych wyników w kontekście poszukiwania biochemicznych wskaźników rozwoju procesu nowotworowego. Dla metody oceniającej profil izoform transferyny, nie zamieszczono współczynników zmienności, co dodatkowo charakteryzowałoby wartość uzyskanych wyników. Dane dotyczące atrybutów metody pomiarowej (np. dokładność, precyzja) mogłyby umocnić kliniczne znaczenie uzyskanych wyników. W literaturze (cytowanej przez Autorkę w pozycji 42) odnajdujemy m.in. współczynniki zmienności wewnątrzdobowej i pomiędzy dniami przeprowadzanych pomiarów, odpowiednio 8,3% i 11,9%, dla disjalotransferyny ocenianej metodą elektroforezy kapilarnej.

Uzyskane wyniki są bardzo interesujące, stanowią zachętę do rozwijania technik pomiaru izoform transferyny i sposobu wyrażania zmian profilu izoform, który ułatwi ocenę względnych wartości glikoform transferyny w praktyce klinicznej. Szczegółowe opracowanie uzyskanych wyników w grupach podstawowych chorób trzustki, daje odpowiedni punkt odniesienia dla ich interpretacji w przypadku nowotworu tego narządu. Brak wpływu lokalizacji i wielkości guza pierwotnego trzustki na stężenie transferyny i profil jej izoform, podobnie jak na stężenie CA 19-9, sugeruje uniwersalizm tych parametrów, stabilizuje ich wartość diagnostyczną u pacjentów z nowotworem trzustki. Dodatkowo może dowodzić agresywności nowotworu, zwłaszcza, że nie obserwowano zaawansowania T1 (tj. guza o średnicy < 2 cm) w badanej grupie. Jedynie u pacjentów z przerzutami odległymi zaobserwowano istotne obniżenie wartości względnych trisjalotransferyny.

Analiza porównań wielokrotnych rutynowych badań laboratoryjnych krwi (aktywności amylazy i lipazy, stężenia białka C-reaktywnego, ceruloplazminy, haptoglobiny, alfa1-kwasnej glikoproteiny oraz jonów wapnia) między badanymi grupami, potwierdza znaczenie tych parametrów w ostrym zapaleniu trzustki i brak ich znaczenia w przypadku nowotworu trzustki. Wyniki te obrazują realną praktykę kliniczną, stanowią charakterystykę pacjentów i wskazują na niedostatek parametrów laboratoryjnych w diagnostyce i monitorowaniu pacjentów z nowotworem trzustki.

Autorka rzetelnie i przejrzysto przedstawiła wyniki przeprowadzonej oceny wartości diagnostycznej stężenia transferyny i wzoru odsetkowego jej izoform, w ostrym i przewlekłym zapaleniu trzustki. Sposób wykorzystania wyników analiz statystycznych przez Doktorantkę podczas omawiania wyników i następnie w dyskusji, pokazuje Jej profesjonalizm w posługiwaniu się narzędziami statystycznymi.

Doktorantka, w sprawnie przeprowadzonej dyskusji, przedstawia uznane i potencjalne znaczenie diagnostyczne izoform transferyny, rozważając przyczyny zmian profilu glikozylacji białek, w tym transferyny u pacjentów z chorobami trzustki. Postawione cele konfrontuje z wynikami badań innych autorów. Zwraca uwagę na potrzebę wczesnej diagnostyki nowotworów trzustki i potencjalny udział medycyny laboratoryjnej w tym problemie. Doktorantka podjęła się trudu oceny reakcji ostrej fazy łącznie z obserwowanymi zmianami profilu izoform transferyny w badanych grupach oraz podgrupach pacjentów, wyodrębnionych ze względu na istotne klinicznie przyczyny ostrego i przewlekłego zapalenia trzustki. Duże uznanie budzi konsekwentne dążenie Doktorantki do wyjaśniania patobiochemii

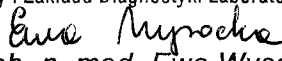
obserwowanych przesunięć we wzorze odsetkowym glikoform transferyny. Przeprowadzona dyskusja pokazuje, że każdej z analizowanych chorób trzustki mogą być przypisane charakterystyczne zmiany wartości względnych izoform transferyny. Autorka sama przyznaje, że zainteresował ją fakt kilkukrotnie wyższych wartości względnych disjalotransferyny w ostrym i przewlekłym zapaleniu trzustki w porównaniu z grupą kontrolną i u chorych z nowotworem trzustki. Dodatkowo wykazała bardzo dobrą moc diagnostyczną tego parametru w przewlekłym zapaleniu trzustki. W tym kontekście szczególnego znaczenia nabiera różnicowanie między przewlekłym zapaleniem a nowotworem trzustki. Zestawienie badanych grup może przybliżyć nas do jednego z możliwych scenariuszy rozwoju nowotworu trzustki: od zapalenia do nowotworzenia. Cennym uzupełnieniem mogłaby być analiza krzywej ROC dla wartości względnych disjalotransferyny i zaproponowanie konkretnej wartości procentowej wraz z czułością i swoistością w różnicowaniu przewlekłego zapalenia i nowotworu trzustki. Autorka może dostarczyć w ten sposób kolejnego impulsu do kontynuowania badań w przedstawionych grupach chorych, a także do zweryfikowania wyników w badaniach prospektywnych pod kątem monitorowania pacjentów z przewlekłym zapaleniem trzustki i wczesnego wykrywania nowotworu tego narządu. Doceniam ostrożność i rozwagę Doktorantki, jednocześnie pragnę zachęcić do formułowania odważnych wniosków, które mogą przyczynić się do intensyfikacji poszukiwań biochemicznych markerów rozwoju nowotworu u pacjentów z przewlekłym zapaleniem trzustki.

Wnioski rozprawy doktorskiej zostały poprawnie sformułowane i odpowiadają postawionym celom. Nowością pracy jest przedstawienie znaczenia zmian profilu izoform transferyny w procesie diagnostyki różnicowej chorób trzustki.

Zebrane 199 pozycji piśmiennictwa, pomijając materiały firmowe dotyczące aparatury i odczynników, zawierają istotne prace z obszaru badanego przez Doktorantkę i w około 6% pochodzą z ostatnich 3 lat, w około 18% z lat 2011-2014 i w około 53% z pierwszej dekady XXI wieku.

Podsumowując, przedłożona do recenzji rozprawa doktorska wpisuje się w nurt poszukiwań biomarkerów chorób trzustki i podnosi znaczenie medycyny laboratoryjnej w praktyce klinicznej. Doktorantka wykazała się znajomością problemów współczesnej diagnostyki chorób trzustki, posłużyła się nowoczesnym warsztatem badawczym i zrealizowała założone cele, a wyniki Jej badań wzbogacają nurt medycyny translacyjnej, przekładającej zdobycze biochemii do praktyki klinicznej.

Stwierdzam, że praca mgr Kariny Lipartowskiej-Klimuk 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 Kariny Lipartowskiej-Klimuk do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Kierownik
Katedry i Zakładu Diagnostyki Laboratoryjnej

dr hab. n. med. Ewa Wysocka