

Lublin, 12-02-2018 r.

Dr hab. n. med. Helena Donica
Zakład Diagnostyki Biochemicznej
Katedra Diagnostyki Laboratoryjnej
UM w Lublinie

OPINIA
dotycząca rozprawy doktorskiej
mgr Kariny Lipartowskiej- Klimuk
na temat:
„Izoformy transferyny w chorobach trzustki”

Choroby trzustki są nadal jednym z największych wyzwań dla współczesnej medycyny. Ostre zapalenie trzustki jest najczęściej występującym stanem zapalnym opisywanym w gastroenterologii, charakteryzującym się niebezpiecznymi powikłaniami. Polska należy do krajów o jednym z najwyższych współczynników zachorowań 72,1/100 000. Ciągłe też wzrasta zapadalność na przewlekłe zapalenie trzustki, które jest procesem zapalnym powodującym postępujące, nieodwracalne zmiany w mięszu z zanikiem i włóknieniem oraz stopniowym rozwojem niewydolności zewnątrzwydzielniczej i wewnątrzwydzielniczej trzustki. Zachorowalność roczną w Polsce ocenia się na 5-10/100 000. Rak trzustki stanowi około 85%

nowotworów tego narządu. Zapadalność w Polsce wynosi średnio około 5,2/100 000. Należy do grupy najgorzej rokujących chorób.

Diagnostyka laboratoryjna chorób trzustki obejmuje szeroki wachlarz badań laboratoryjnych, w większości charakteryzujących się niską czułością i swoistością diagnostyczną. Zupełnie brak jest wiarygodnych badań laboratoryjnych pozwalających na rozpoznanie i różnicowanie zwłaszcza przewlekłego zapalenia trzustki i raka trzustki. Z uwagi na to nadal poszukuje się nowych biomarkerów, ponieważ rozpoznanie sprawia wiele problemów z powodu niebyt specyficznych objawów, natomiast rak trzustki ze względu na jego późną wykrywalność, cechuje się szybkim, agresywnym przebiegiem i złym rokowaniem. Poszukiwanie przez Doktorantkę nieinwazyjnych laboratoryjnych wskaźników chorób trzustki jest zamierzeniem celowym.

W chorobach trzustki, zwłaszcza o podłożu zapalnym może dochodzić do zmian stężeń wielu białek, które w większości są glikoproteinami. Poza zmianami ilościowymi mogą to być zmiany profilu izoform. Rodzi się pytanie czy zmiany te mogą być wykorzystane w celach diagnostycznych lub prognostycznych. Dobrym modelem do badań jest transferyna. Profil izoform transferyny składa się z pięciu podstawowych frakcji. W stanach fizjologicznych profil izoform jest względnie stały. W chorobach trzustki może dochodzić do zaburzeń glikozylacji.

W świetle tych wstępnych rozważań należy podkreślić celowość wyboru tematu rozprawy doktorskiej **„Izoformy transferyny w chorobach trzustki”**, jakiego dokonała mgr Karina Lipartowska-Klimuk.

Przedstawiona do oceny praca ma układ typowy dla rozpraw na stopień doktora nauk medycznych. Jest bardzo starannie przygotowana pod względem naukowym i graficznym. Liczy ona 160 stron tekstu, podzielonych na klasyczne

rozdziały, w tym: wstęp (38 stron), cel pracy, materiał i metody (14 stron), wyniki badań (43 strony), dyskusja (19 stron), wnioski i streszczenie w języku polskim i angielskim, piśmiennictwo (199 pozycji) oraz wykaz tabel i rycin, które zawierają wyniki przeprowadzonych badań i ich analizę statystyczną, co znacznie ułatwia śledzenie i rozumienie treści dysertacji oraz załącznik zgody Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku. Najbardziej istotne dla oceny poprawności formalnej pracy zagadnienia takie jak zgodność założeń, metod, celów, wyników badań i wniosków nie budzą zastrzeżeń.

We wstępie liczącym 38 stron maszynopisu Doktorantka uzasadnia wybór tematu. Po krótkim omówieniu budowy i funkcji oraz klasyfikacji chorób trzustki Doktorantka przedstawia badania laboratoryjne powszechnie wykorzystywane w diagnostyce ostrego i przewlekłego zapalenia trzustki oraz w raku trzustki. Doktorantka wyraźnie podkreśla, że we wczesnym okresie przewlekłego zapalenia trzustki, jak i w początkowej fazie nowotworów trzustki wyniki badań laboratoryjnych zazwyczaj są prawidłowe. Brak jest wskaźników biochemicznych wskazujących na toczący się proces chorobowy we wczesnej fazie. Dalej zajmuje się problemami stanowiącymi podstawę teoretyczną samej pracy doktorskiej. Omawia proces i typy glikozylacji białek. W końcowej części wstępu koncentruje się na transferynie, która jest białkiem wykazującym polimorfizm związany z różnym stopniem glikozylacji (sjalilacji). W przebiegu ostrego zapalenia trzustki dochodzi do upośledzenia procesu sjalilacji transferyny. Stopień sjalilacji transferyny odzwierciedla nasilenie reakcji zapalnej w przebiegu ostrego zapalenia trzustki.

Informacje przekazane we wstępie, oparte na bogatej literaturze przedmiotu stanowią wprowadzenie do zagadnień, które są przedmiotem pracy. Opracowanie to stanowi dobrą podstawę do sformułowania celu badań

własnych i świadczy o bardzo dobrym teoretycznym i praktycznym przygotowaniu tematu.

Celem pracy była ocena stężenia izoform transferyny w przebiegu chorób trzustki o różnej etiologii i określenie ich przydatności w diagnostyce podstawowej i różnicowej, a w szczególności:

1. Określenie i ocena zmian całkowitego stężenia transferyny i izoform transferyny w surowicy krwi pacjentów z ostrym i przewlekłym zapaleniem trzustki oraz pierwotnym nowotworem trzustki
2. Ocena wpływu lokalizacji pierwotnego nowotworu trzustki, wielkości guza i przerzutów do regionalnych i odległych węzłów chłonnych na stężenie izoform transferyny oraz markera CA 19.9
3. Ocena współzależności zmian stężenia izoform transferyny z innymi badaniami w chorobach trzustki
4. Ocena i porównanie mocy diagnostycznej transferyny i jej izoform w chorobach trzustki

Zaplanowane badania przeprowadzono u 113 pacjentów (23 kobiet i 90 mężczyzn) w wieku od 25 do 75 lat z różnymi chorobami trzustki hospitalizowanych w II Klinice Chirurgii Ogólnej i Gastroenterologii Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku. Z grupy badanej wydzielono 3 podgrupy chorych: z ostrym zapaleniem trzustki, przewlekłym zapaleniem trzustki i z pierwotnym nowotworem trzustki. W grupie chorych z ostrym i przewlekłym zapaleniem byli pacjenci z zapaleniem pochodzenia alkoholowego i kamiczego. Z grupy chorych z pierwotnym nowotworem trzustki wyodrębniono podgrupy w zależności od umiejscowienia guza, stopnia zaawansowania klinicznego nowotworu. Grupę odniesienia stanowiło 30 osób dobranych prawidłowo pod względem wieku i płci do grupy badanej. Wszyscy pacjenci wyrazili zgodę na przeprowadzenie badań, które zostały

zaakceptowane przez Komisję Bioetyczną Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku.

Do tej części pracy mam następującą uwagę. Doktorantka opisując zasady kwalifikacji pacjentów do poszczególnych grup nie podała, kto kwalifikował i wykluczał pacjentów do badania.

U wszystkich badanych i w grupie kontrolnej oznaczano: aktywność amylazy, lipazy, stężenie glukozy, bilirubiny, wapnia całkowitego, CRP, haptoglobiny, alfa-1-kwaśnej glikoproteiny, ceruloplazminy i CA 19.9 z wykorzystaniem komercyjnych odczynników i wysokiej klasy analizatorów. Stężenie izoform transferyny w surowicy krwi oznaczano metodą elektroforezy kapilarnej z użyciem zestawu odczynnikowego Minicap CDT.

Niewątpliwie pozytywnymi elementami metodycznymi pracy, wpływającymi w istotny sposób na wartość uzyskanych wyników badań są: czytelny opis metod i procedur stosowanych w realizacji pracy oraz bardzo dobry warsztat pracy badawczej z wykorzystaniem komercyjnych odczynników i wysokiej klasy analizatorów, umiejętne jego wykorzystanie oraz rzetelność przeprowadzanych badań, gwarantującą wysoką jakość uzyskanych wyników.

Rozdział IV „Wyniki Badań” jest obszerny i obejmuje 43 strony. Podzielony jest na 9 podrozdziałów. Wyniki badań mgr Karina Lipartowska-Klimuk przedstawiła w formie dobrze opracowanych, czytelnych 32 tabel i 13 rycin. Należy podkreślić dużą staranność, estetyczność i przejrzystość tabel i rycin. Także kolejność przedstawiania rezultatów badań jest zgodna z wytyczonymi celami badań. Przed wyborem testu statystycznego (parametrycznego lub nieparametrycznego) Doktorantka przeprowadziła ocenę zgodności rozkładu badanej cechy z rozkładem normalnym. Zaproponowana analiza statystyczna spełnia wymogi obiektywnej

oceny wyników badań. Wnioskowanie przeprowadzono na poziomie istotności $p < 0,05$.

Niezmiernie ważne są obserwacje poczynione przez Doktorantkę dotyczące wartości oznaczania profilu izoform transferyny w chorobach trzustki o różnej etiologii. Profil ten zmienia się we wszystkich chorobach trzustki. W ostrych i przewlekłych zapaleniach trzustki podwyższone jest stężenie disjalo-Tf (disjalo-transferyny), a obniżone jest stężenie pentasjalo-Tf. Moc diagnostyczna disjalo-Tf jest bardzo dobra w przewlekłych zapaleniach trzustki, a w ostrych dobra. Wzrost stężenia disjalo-Tf w obu typach zapaleń przy obniżeniu całkowitego stężenia transferyny może wskazywać na reakcję ostrej fazy z upośledzeniem glikozylacji (hipoglikozylacja/hiposjalacja). W ostrych i przewlekłych zapaleniach o etiologii alkoholowej stężenie disjalo-Tf jest wyższe a tetrasjalo-Tf niższe w porównaniu do zapaleń pochodzenia kamiczego, co ma ogromne znaczenie w różnicowaniu zapaleń pochodzenia alkoholowego i niealkoholowego. Natomiast w pierwotnym raku trzustki stężenie tetrasjalo-Tf jest podwyższone, a pentasjalo-Tf obniżone przy prawidłowym stężeniu transferyny, co wskazuje na zaburzenia glikozylacji. Profil izoform nie zależy od lokalizacji nowotworu, wielkości guza i przerzutów do regionalnych węzłów chłonnych.

W dyskusji Doktorantka trafnie konfrontuje uzyskane wyniki z nielicznymi danymi z literatury i stara się wyjaśnić potencjalne mechanizmy prowadzące do zmian wartości oznaczanych parametrów i ich znaczenia diagnostycznego. Dyskusja została przeprowadzona rzeczowo, a analiza wyników badań pozwoliła na poczynienie szeregu spostrzeżeń mających istotne znaczenie w diagnostyce chorób trzustki. Przy tej okazji chciałabym zwrócić uwagę na to, iż Doktorantka w dyskusji zbyt dużo miejsca poświęciła uzasadnianiu celowości przeprowadzonych badań.

Bazę źródłową stanowiło 199 pozycji piśmiennictwa przede wszystkim anglojęzycznego. Literatura jest aktualna (znacząca część opublikowana po 2010 roku) i związana z zakresem badań prowadzonych w pracy doktorskiej.

Wnioski w liczbie 7 są wiarygodnym odzwierciedleniem wyników badań własnych, a także stanowią logiczną odpowiedź na postawione cele badań. Wnioski sformułowane w niniejszej pracy mogą być cennymi wskazówkami w praktyce klinicznej.

Uzyskane wyniki badań stanowią istotne uzupełnienie wiedzy w obszarze poszerzenia możliwości wykorzystania nieinwazyjnych badań w diagnostyce i różnicowaniu chorób trzustki o różnej etiologii. Autorka wykazała się znajomością tematu i warsztatu badawczego oraz umiejętnością rozwiązania problemu badawczego wymagającego dużego nakładu pracy.

Podsumowując ocenianą pracę mgr Kariny Lipartowskiej-Klimuk wykonaną w Zakładzie Laboratoryjnej Diagnostyki Pediatrycznej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku pod kierunkiem dr hab. n. med. Bogdana Cylwika należy podkreślić, iż Doktorantka w pełni zrealizowała postawione wstępnie cele. Praca doktorska mgr Kariny Lipartowskiej-Klimuk stanowi nowatorskie opracowanie o dużej wartości poznawczej i praktycznej. Zarówno wybór tematu, wykonanie pracy, jak i przygotowanie szaty graficznej oceniam wysoce pozytywnie. Recenzowana praca odpowiada wymogom stawianym dysertacjom doktorskim, dodatkowo jest łatwa w odbiorze i czyta się ją z przyjemnością.

Mam zaszczyt przedstawić Wysokiej Radzie Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku wniosek o dopuszczenie mgr Kariny Lipartowskiej-Klimuk do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

KIEROWNIK
Zakładu Diagnostyki Biochemicznej
Helena Donica
dr hab. Helena Donica
profesor nadzwyczajny AM