

Warszawski Uniwersytet Medyczny
Zakład Medycyny Laboratoryjnej
Ul. Banacha 1a, 02-097 Warszawa
Tel. 22 5992405
e-mail: olga.ciepiela@wum.edu.pl

Recenzja rozprawy doktorskiej Mgr Aleksandry Maleszki

pt. „Rozbieżności badań laboratoryjnych w diagnostyce chorób związanych z dyskrazją komórek plazmatycznych”

Promotor pracy: dr hab. Ryszard Drożdż

Promotor pomocniczy: dr Joanna Tisończyk

Dyskrazje komórek plazmatycznych to schorzenia, w których obserwuje się rozrost klonu plazmocytołów produkujących immunoglobuliny. Ze względu na klonalny rozrost komórek, immunoglobuliny przez nie uwalniane nazywamy monoklonalnymi. Do grupy dyskrazji plazmocytołowych należą m.in. MGUS (gammapatia monoklonalna o niokreślonym znaczeniu), szpiczak plazmocytołowy, amyloidoza AL czy guz plazmatyczno-komórkowy. MGUS jest uznany za stan przednowotworowy, w którym stężenie białka monoklonalnego w surowicy nie przekracza 30 g/l a pacjent nie prezentuje objawów klinicznych szpiczaka. W szpiczaku plazmocytołowym u pacjentów występuje uszkodzenie narządów związane z chorobą, które rozpoznaje się na podstawie parametrów określonych akronimem SLiM CRAB (zwiększenie stężenia wapnia całkowitego w osoczu jako oznaka lizy kostnej; zwiększenie stężenia kreatyniny w osoczu, będące wykładnikiem uszkodzenia nerek, niedokrwistość, zidentyfikowane obszary lizy kostnej w badaniu CT lub PET-CT, odsetek klonalnych plazmocytołów w szpiku lub biopsji tkankowej co najmniej 60%, stosunek stężenia klonalnych do nieklonalnych wolnych łańcuchów lekkich w surowicy co najmniej 100 oraz obecność co najmniej dwóch ogniskowych nacieków w badaniu rezonansu kośćca).

Obecnie podstawą do rozpoznania dyskrazji plazmocytołowych jest wykrycie klonalnego rozrostu plazmocytołów w szpiku, co często jest poprzedzone wykryciem białka monoklonalnego w surowicy za pomocą badania elektroforetycznego i immunofiksacji.

Ponieważ dyskrazje plazmocytowe dotyczą bardzo dużą grupę osób (występowanie MGUS szacuje się nawet na 3,2% populacji do 50 roku życia, a szpiczak stanowi 1% wszystkich rozpoznań nowotworowych w Polsce), tematyka ich efektywnej i wczesnej diagnostyki jest niezwykle ważna. Ze względu na różnice między pacjentami, mnogość badań laboratoryjnych, jakie wykonuje się w procesie diagnostycznym pacjentów z dyskrazjami oraz interferowanie białka monoklonalnego w niektóre z oznaczeń laboratoryjnych, temat rozbieżności w wynikach badań pacjentów z tymi zaburzeniami jest ważny i godny przeanalizowania.

Przedstawiona mi do recenzji praca, zawarta w 142 stronach maszynopisu, ma typowy układ dla dysertacji doktorskich. Składa się z 11 głównych rozdziałów i wykazu stosowanych skrótów. Piśmiennictwo obejmuje 130 pozycji, z czego 46 prac pochodzi z ostatnich 5 lat. Zdecydowana większość cytowanych prac została opublikowana w czasopiśmie zagranicznych ujętych w wykazie Journal Citation Reports. W rozprawie piśmiennictwo uporządkowane jest w kolejności cytowania. W pracy Autorka umieściła 61 rycin i 23 tabele, które w sposób wyczerpujący prezentują założenia teoretyczne i wyniki rozprawy. Pod względem edytorskim praca przygotowana jest bardzo dobrze, uwagę zwraca duża staranność Doktorantki w przygotowaniu graficznej prezentacji rozprawy, chociaż nie uniknęła ona drobnych błędów literowych.

We wstępie Doktorantka opisuje proces diagnostyczny pacjentów z dyskrazjami plazmocytowymi, możliwe interferencje, nieprawidłowości w wynikach badań i trudności metodyczne. Zwracam uwagę na błąd w tytule podrozdziału 1.9, zarówno w spisie treści jak i w samej pracy – Autorka zamiast „daratumumab” napisała „daratomumab”. Wydaje się, że wstęp pisany jest raczej językiem zwyczajowym niż *stricte* naukowym – proszę pamiętać, żeby w tekstach naukowych nie stosować skrótów myślowych (np. rozdział 1.2, str. 11 – Doktorantka pisze, że „jednym z najbardziej charakterystycznych objawów chorobowych jest obecność białka monoklonalnego” – zdaniem recenzenta po pierwsze należałoby określić, gdzie to białko można znaleźć, a po drugie – sama obecność białka monoklonalnego objawem chorobowym nie jest – pacjenci zazwyczaj nie „odczuwają” jego obecności a jedynie skutki jego obecności). Na stronie 20 w akapicie dotyczącym albuminy i β 2-mikroglobuliny brakuje informacji, do jakiego materiału badanego odnosi się oznaczanie tych białek. Biorąc pod uwagę, że Autorka pisze o niskim stężeniu albuminy, zapewne akapit ten dotyczy surowicy. Należy jednak pamiętać, że oba białka można oznaczać również w moczu (o którym Doktorantka wspomina wcześniej w rzeczonym rozdziale). Są to drobiazgi, które zapewne wynikają z głębokiego wniknięcia Autorki w temat. Jednak należy mieć na uwadze, że dla innych odbiorców tekstu poruszane

zagadnienia nie muszą być tak oczywiste jak dla Autorki. Warto wyeliminować również skrót myślowy ze strony 24, w którym Doktorantka wskazuje, że „wczesne wykrycie choroby wiąże się z dłuższym przeżyciem”. Jeśli za wczesnym wykryciem choroby nastąpi wcześniejsze rozpoczęcie procesu terapeutycznego, to efekt taki faktycznie można osiągnąć. Samo wczesne wykrycie bez podjęcia leczenia na czas przeżycia pacjenta z pewnością nie wpłynie. Proszę również pamiętać, że u pacjentów z dyskrazjami plazmocytowymi OB często jest przyspieszone, a nie przedłużone.

Merytoryczna uwaga dotycząca wstępu odnosi się do stwierdzenia ze strony 21, gdzie Autorka podaje, że podczas elektroforezy kapilarnej wykonuje się immunosubtrakcję. Nie jest to prawda – immunosubtrakcja jest niejako badaniem zastępczym dla immunofiksacji i nie jest rutynową składową wykonywania proteinogramu metodą elektroforezy kapilarnej. Zwracam również uwagę, że przy analizie densytometrycznej nie ocenia się wysokości piku dla białek, a jego pole powierzchni.

W oparciu o wstęp teoretyczny Autorka postawiła sobie cel badawczy, którym była analiza trudności diagnostycznych oraz przyczyn rozbieżności wyników badań laboratoryjnych u pacjentów z gammapatią monoklonalną.

W rozdziale Materiały i Metody Doktorantka szczegółowo opisuje grupę badaną, której wyniki badań opisuje w dalszej części rozprawy oraz metodykę badań. Zwracam uwagę, aby opisując warunki wirowania podawać raczej wielkość „g” zamiast liczbę obrotów na minutę, ponieważ siła wirowania w przypadku rpm zależy od promienia rotora w wirówce. Metodyka prowadzonych badań została opisana wyczerpująco, a metody statystyczne wykorzystane w pracy zostały zastosowane właściwie.

W rozdziale 4 „Wyniki” Doktorantka opisuje uzyskane przez siebie rezultaty badań. W pierwszym kroku swoich badań pani magister porównała wyniki oznaczenia stężenia albuminy metodami kolorymetryczną i elektroforetyczną, wykazując istotne statystycznie różnice. Co więcej, wykazała, że różnice w pomiarze stężenia tego białka mają inny charakter w grupie badanej (niższe stężenia albuminy mierzonej metodą kolorymetryczną) niż w grupie kontrolnej (wyższe stężenia albuminy mierzonej metodą kolorymetryczną). Słuszną uwagę Autorka poczyniła na str. 53 rozprawy, sugerując że pomiar stężenia albuminy metodą elektroforetyczną u pacjentów z gammapatiami monoklonalnymi może wiązać się z niedoszacowaniem ich stanu klinicznego. W dalszej części rozdziału „Wyniki” Doktorantka wykazała różnice w pomiarze stężenia białka monoklonalnego przy zastosowaniu rozdziału 5 i 6 frakcyjnego. W opinii recenzenta jednymi z najcenniejszych obserwacji poczynionych przez Autorkę jest określenie czułości testów paskowych do wykrywania łańcuchów lekkich immunoglobulin i wykazanie że czułość ta jest wyższa dla łańcuchów kappa niż lambda.

Dużo więcej kontrowersji w mojej opinii dotyczy podrozdziału 4.4 dotyczącego niespójności w oznaczaniu stężenia łańcuchów lekkich różnymi metodami diagnostycznymi. Na początek tylko drobna uwaga stylistyczna, związana z użyciem pleonazmu (str.62) - ilość z założenia jest niepoliczalna. Jeśli nie można oszacować stężenia danego białka w konkretnej strefie, warto użyć sformułowania „niemierzalna ilość”. Uwagę recenzenta zwróciło mało krytyczne stwierdzenie, że test Freelite w kilku prezentowanych przypadkach zawyża stężenie łańcuchów lekkich. O ile w przypadku nr 1 takie stwierdzenie jest w pełni uzasadnione, o tyle w pozostałych przypadkach – bez dogłębnej analizy przypadków, teza ta wydaje się kontrowersyjna. W pierwszej kolejności należy wziąć pod uwagę, że testy TLC i Freelite wykorzystują zupełnie inną technikę badawczą (TLC – przeciwciała monoklonalne do pomiaru całkowitego stężenia łańcuchów lekkich, Freelite – przeciwciała poliklonalne do pomiaru wolnych łańcuchów lekkich). Dlaczego przy uzyskaniu tych rozbieżności nie dokonano oceny stężenia całkowitych immunoglobulin? Skąd pewność, że test TLC był w stanie wykryć zmodyfikowane w procesie nowotworowym epitopy na łańcuchach lekkich i daje wartość właściwą? Sugeruję jednak, aby stawiając tak odważną tezę, przeanalizować wszystkie możliwości i nieco ostrożniej podchodzić do interpretacji obserwowanych zjawisk.

Przypadki dotyczące przemijającej gammapatii są bardzo ciekawe i wartościowe. W tabelach 15 i 16 użyto form nazw enzymów „Alat” i „Aspat” – proszę pamiętać, że właściwe formy skróconych nazw tych enzymów to ALT (AlAT) i AST (lub AspAT).

W rozdziale dotyczącym neurologicznej manifestacji gammapatii monoklonalnych Autorka przedstawiła dwa przypadki obecności prążków monoklonalnych w PMR i surowicy, z 11 które wyodrębniła z grupy 1142 pacjentów poddanych badaniu. Co ciekawe, częstość występowania gammapatii w tej grupie oszacowano na 0,96%. Porównując to do 3% MGUS w populacji ogólnej, można by nieśmiało wnioskować że zaledwie u 1/3 osób z MGUS białko monoklonalne przedostaje się przez barierę krewPMR. Wartościowym rozdziałem jest również opis wpływu krioglobulinemii i zespołu nadlepkości na wyniki badań laboratoryjnych. W przypadku pacjenta 12 warto by przeanalizować również histogramy rozkładu wielkości płytek krwi – być może udałoby się zaobserwować wpływ fragmentocytów na zwiększenie wyniku liczby PLT. Z przypadkami pacjentów opisanymi w podrozdziale dotyczącym pacjentów poddawanych immunoterapii terapeutycznymi przeciwciałami monoklonalnymi warto podzielić się z klinicystami, którzy często oczekując wyniku wskazującego na całkowitą remisję zapominają poinformować pracownię diagnostyczną o stosowanym leczeniu, a uzyskiwany dodany wynik proteinogramu i immunofiksacji nie pozwala im stwierdzić CR.

Na końcu rozdziału „Wyniki” doktorantka porusza kwestię zaburzeń krzepnięcia u pacjentów z gammapatiami monoklonalnymi. Biorąc pod uwagę, że najczęstszą interferencją w przebiegu gammapatii monoklonalnych jest wiązanie się łańcuchów lekkich do czynnika X krzepnięcia, proszę o

odniesienie się do zasadności oznaczania cz. VIII i VII w tej sytuacji (oczywiście to lekarz a nie diagnosta zleca oznaczenia laboratoryjne, jednak warto abyśmy prowadzili z lekarzami dialog dotyczący właśnie zasadności zlecenia niektórych badań, które z punktu widzenia metodyki czy patofizjologii właśnie nie wnoszą do procesu diagnostyczno-terapeutycznego istotnych informacji). W tym rozdziale stanowczo nie mogę się zgodzić z opinią Doktorantki dotyczącą niespójności wyniku oznaczenia aktywności cz. VIII w przedstawionym przypadku klinicznym. Biorąc pod uwagę wysokie stężenie fibrynogenu i z całą pewnością toczący się stan ostry u pacjenta, wynik oznaczenia cz. VIII nie powinien dziwić. Bardzo proszę o wskazanie, który z czynników biorących udział w procesie krzepnięcia w tej sytuacji również byłby podwyższony.

Kolejnym rozdziałem w rozprawie jest dyskusja podzielona na podrozdziały. Dyskusja prowadzona jest płynnie. Autorka właściwie dobrała literaturę do przygotowania tej części pracy, choć wciąż brakuje mi jednak głębszej analizy przyczyn rozbieżności wyników między testami Freelite i TLC, a w szczególności – przedyskutowania przyczyn zaburzeń układu krzepnięcia u pacjentów z gammopatiami monoklonalnymi. Przy przygotowaniu wyników rozprawy do publikacji warto pochylić się nad tym tematem i uwzględnić również wpływ leków immunomodulujących typu lenalidomid na hemostazę pacjenta.

W rozdziale 6, na podstawie przeprowadzonych przez siebie badań, Doktorantka przedstawia 9 wniosków. W mojej opinii punkty 7 i 8 nie są wnioskami wyciągniętymi z pracy, a opisanymi procedurami badawczymi, dlatego nie powinny się znaleźć w tym rozdziale. Pozostałe punkty ujęte przez Autorkę są w pełni uzasadnione.

Z czystego obowiązku recenzenta muszę zauważyć, że praca pisana jest bardzo dobrym stylem, czyta się ją z zainteresowaniem i zrozumieniem. W rozprawie pojawiają się pojedyncze błędy literowe, kolokwializmy (jak poziom białka, a nie stężenie) jednak, pragnę podkreślić, że w żaden sposób nie umniejsza to wartości naukowej przedstawionej mi do recenzji pracy.

Podsumowując, rozprawę na stopień naukowy doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu mgr Aleksandry Maleszki oceniam pozytywnie. Doktorantka wykazała dobre przygotowanie teoretyczne, opanowanie warsztatu badawczego oraz umiejętność analizy uzyskanych wyników. Tematyka przedstawiona w niniejszej rozprawie z całą pewnością spotkałaby się z zainteresowaniem klinicystów i diagnostów laboratoryjnych na całym świecie, dlatego warto tę pracę przygotować do publikacji w międzynarodowym czasopiśmie medycznym.

W mojej ocenie rozprawa spełnia warunki określone w art.187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U.2018 poz.1668), dlatego wnoszę do Wysokiej Rady Dyscypliny

Nauki o zdrowiu Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum o dopuszczenie pani mgr Aleksandry Maleszki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Kierownik
Zakład Medycyny Laboratoryjnej
Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego
Prof. dr hab. n.med.i n.o zdr. Olga Ciepiela