

Białystok, 30-10-2023

Recenzja rozprawy doktorskiej

mgr Aleksandry Maleszki

p.t.: „Rozbieżności badań laboratoryjnych w diagnostyce chorób
związanych z dyskrazją komórek plazmatycznych ”

Tematyka przedstawionej do oceny rozprawy doktorskiej dotyczy aktualnego zagadnienia, związanego z grupą chorób, charakteryzujących się nowotworowym rozrostem plazmocytów. W wielu przypadkach obserwuje się wówczas wytwarzanie białka M, czyli monoklonalnej immunoglobuliny lub/i jej podjednostek. Na podstawie danych literaturowych wiadomo, że do najczęstszych schorzeń w tej grupie należy szpiczak plazmocytowy (Plasma Cell Myeloma - PCM), przy czym wśród nowotworów wywodzących się z komórek plazmatycznych, oprócz pełnoobjawowego PCM, można wyróżnić także szpiczaka bezobjawowego, szpiczaka niewydzielającego oraz białaczkę plazmatyczno-komórkową.

W związku z faktem, iż szpiczak plazmocytowy pod względem klinicznym może powodować bardzo zróżnicowane objawy, zaś opieka nad chorymi na PCM jest multidyscyplinarna, należy podkreślić, iż poruszane zagadnienie jest istotne nie tylko z naukowego, ale też praktycznego punktu widzenia.

Rozprawa doktorska mgr Aleksandry Maleszki obejmuje 142 strony maszynopisu i zawiera 23 tabele oraz imponującą ilość, bo aż 61 rycin, a także 130 pozycji piśmiennictwa. Rozpoczyna się ciekawym, 35. stronicowym wstępem, który Autorka dzieli na II zasadniczych działów, bezpośrednio związanych z badanymi problemami. W pierwszej części Doktorantka przedstawia bardzo interesującą tematykę, dotyczącą klasyfikacji i charakterystyki dyskrazji plazmocytowych. W dalszej części pracy Autorka przechodzi do opisu metod oznaczania białek w dyskrazjach plazmocytowych, przedstawienia trudności związanych z oznaczaniem białka monoklonalnego metodą elektroforetyczną oraz możliwych nieprawidłowości, interferencji oraz problemów metodycznych w badaniach laboratoryjnych u pacjentów z dyskrazjami plazmocytowymi, a także najczęstszych nieprawidłowości w wynikach podstawowych badań laboratoryjnych u tych chorych oraz trudności metodyczne oznaczania łańcuchów lekkich immunoglobulin, jak również zjawisko przemijających i wtórnych gammapatii monoklonalnych oraz wpływ krioglobulin i zespołu nadlepkoci na wyniki badań

laboratoryjnych. Ostatnia część wstępu jest poświęcona bardzo ważnej i aktualnej tematyce, tj. zagadnieniu związanemu z wprowadzeniem przełomowego leku w terapii celowanej szpiczaka mnogiego oraz związanymi z tym faktem interferencjami w badaniach laboratoryjnych. Daratumumab jest monoklonalnym przeciwciałem IgG-kappa, stąd też jego zastosowanie może wpływać na wyniki elektroforezy białek oraz immunofiksację białek surowicy. Jest to istotne w związku z faktem, iż zgodnie z rekomendacjami Polskiej Grupy Szpiczakowej monitorowanie poziomu białka monoklonalnego jest zalecane w przebiegu oceny odpowiedzi na terapię, a ujemna immunofiksacja białek surowicy i moczu jest jednym z kryteriów całkowitej remisji choroby. Przedstawiona we wstępie wiedza jest wzbogacona przejrzystymi tabelami i rycinami oraz oparta na aktualnej literaturze światowej, przy czym przed wysłaniem pracy do druku proponowałabym rozważyć zastąpienie określenia „elektroforeza surowicy” na „elektroforeza białek surowicy”.

Cel pracy został przedstawiony w sposób klarowny. Obejmował on analizę trudności diagnostycznych oraz przyczyn rozbieżności wyników badań laboratoryjnych u pacjentów z gammopatią monoklonalną poprzez realizację celów szczegółowych takich, jak wykazani rozbieżności wniosków stężenia albuminy w surowicy krwi, oznaczonej z użyciem zieleni bromokrezolowej oraz w oparciu o pik albuminowy w rozdziale elektroforetycznym na żelu agarozowym; porównanie oznaczenia stężenia białka monoklonalnego metodą elektroforezy 5 i 6—frakcyjnej; analizę czułości analitycznej wykrywania wolnych łańcuchów lekkich immunoglobulin w moczu za pomocą testów paskowych; zbadanie niespójności analitycznych dotyczących wyników oznaczania wolnych łańcuchów lekkich immunoglobulin w surowicy; analizę wyników badań laboratoryjnych w trakcie występowania tak zwanych przejściowych i wtórnych gammopatii monoklonalnych; opisanie specyfiki wykrywania gammopatii monoklonalnych u pacjentów z zaburzeniami neurologicznymi; zbadanie wpływu krioglobulin i zespołu nadlepkości na wyniki badań laboratoryjnych oraz opisanie procedur postępowania z materiałem badanym w celu eliminacji interferencji; przedstawienie oceny wpływu daratumumabu na wyniki badań laboratoryjnych oraz przedstawienie możliwych interferencji w badaniach układu krzepnięcia u chorych na dyskracje plazmocytowe i sposobów ich ograniczenia.

Rozdział „Materiał i metody” rozpoczyna się od opisu grupy badanej. W ramach realizacji pracy doktorskiej przeanalizowano badań 99 pacjentów, u których wykryto w surowicy białko monoklonalne. Materiał do badań był kierowany do Centralnego Laboratorium Krakowskiego Szpitala Uniwersyteckiego z klinik: Hematologii, Chorób Wewnętrznych oraz Nefrologii. U większości grupy badanej zostało postawione rozpoznanie dyskracji plazmocytowych. Do analizy rozbieżności wyników oznaczania albuminy w surowicy krwi wykorzystano wyniki 50 pacjentów z dyskracjami plazmocytowymi. Włączono także grupę kontrolną, która stanowiło 157 pacjentów bez dyskracji plazmocytowych oraz bez białka monoklonalnego w surowicy. W celu wyznaczenia czułości testów paskowych dla łańcuchów

lekkich w moczu przeanalizowano wyniki 21 pacjentów. Celem porównania oznaczania stężenia białka monoklonalnego metodą elektroforezy 5. i 6-frakcyjnej analizowano wyniki 12. pacjentów. Wyniki pozostałych pacjentów przeanalizowano w postaci analizy przypadków. Ponadto przeanalizowano wyniki elektroforegramów PMR i surowicy 1442 pacjentów celem określenia, z jaką częstością wśród pacjentów z objawami neurologicznymi, którzy kierowani są na badanie na obecność prążków oligoklonalnych w PMR, występują prążki monoklonalne w PMR. W tym miejscu miałabym pytanie, w jakim okresie czasu, tj. jak długo trwało zbieranie ww. grup badanych.

W pracy zastosowano właściwe metody analityczne, zaś analizę statystyczną uzyskanych wyników przeprowadzono przy użyciu pakietu statystycznego Statistica (wersja 13.3). Do badania normalności rozkładu stosowano test Shapiro-Wilka. W przypadkach, gdzie nie potwierdzono zgodności z rozkładem normalnym, do porównań między grupami użyto testów nieparametrycznych. W celu porównania stężenia białka M zastosowano test Studenta dla zmiennych zależnych.

Wyniki badań zostały starannie zaprezentowane w kolejnym rozdziale rozprawy i są zgodne z wytyczonymi wcześniej celami. Na uwagę zasługuje fakt, iż zarówno w grupie pacjentów z dyskrazjami, jak i w grupie kontrolnej, "kazano, że stężenia albuminy mierzonej metodą kolorymetryczną oraz elektroforetyczną różnią się znamienne statystycznie, przy czym w grupie pacjentów z dyskrazjami stężenia albuminy mierzone metodą elektroforetyczną są wyższe, zaś w grupie kontrolnej niższe niż w metodzie kolorymetrycznej. Ważnym też jest wykazanie, iż stężenia białka M oszacowane na podstawie różnych systemów elektroforetycznych różnią się istotnie statystycznie. U wszystkich pacjentów stężenia białka M oszacowane metodą 6-frakcyjną było wyższe niż w przypadku techniki 5-frakcyjnej. Bardzo ciekawym i ważnym aspektem dysertacji jest ponadto analiza przypadków, obejmująca takie zjawiska, jak niespójności analityczne w oznaczaniu wolnych łańcuchów lekkich w surowicy, opis zjawiska przemijającej i wtórnej gammapatii monoklonalnej, czy też problemów w interpretacji wyników chorych leczonych daratumumabem.

W kolejnej części pracy Autorka analizuje własne wyniki badań w ciekawy i przejrzysty sposób, porównując rezultaty własnych badań z danymi literaturowymi, a na koniec tych rozważań dochodzi do wniosków, będących odpowiedzią na wcześniej postawione cele. Jednym z nich jest stwierdzenie, iż wyniki albuminy, oznaczonej różnymi metodami mogą się znacząco różnić, zaś prezentowana praca jednoznacznie wykazała niespójność oznaczeń stężeń albuminy w metodzie kolorymetrycznej i elektroforetycznej oraz wskazuje na metodę kolorymetryczną jako referencyjną u pacjentów z dyskrazjami plazmocytowymi. Ponadto Doktorantka słusznie wnioskuje, że ilościowe wyniki oznaczania białka monoklonalnego zależą od zastosowanej metody elektroforetycznej. Przy niskich stężeniach białka M wartość wyliczona z elektroforezy może być obciążona błędem. Stąd też ważna jest uwaga Autorki, iż w trudnych przypadkach raport powinien zawierać ilościowy wynik immunochemicznego

oznaczenia immunoglobuliny (klasy związanej ze strefą monoklonalną) i być spójny z interpretacją wyniku immunofiksacji, zaś jako dokładniejsza do monitorowania chorych z dyskrazjami plazmocytowymi powinna być rekomendowana elektroforetyczna metoda dzieląca białka surowicy na 6 frakcji. Bardzo istotna jest też konkluzja wskazująca, że pojawienie się prążków monoklonalnych w PMR może być pierwszą nieprawidłowością w wynikach badań laboratoryjnych u pacjenta z dyskrazją plazmocytową z objawami neurologicznymi. Bardzo ważny z punktu widzenia praktycznego jest wniosek, iż u pacjentów z dyskrazją komórek plazmatycznych, u których istnieje podejrzenie interferencji w badaniach laboratoryjnych układu krzepnięcia i fibrynolizy, z uwagi na niespójne wyniki czasów krzepnięcia w odniesieniu do stanu klinicznego pacjenta, należy zastosować szereg działań, mających na celu eliminację interferencji, w tym wprowadzenie serii rozcieńczeń próbki osocza, zastosowanie metody optomechanicznej i turbidymetrycznej.

Podsumowując przedstawioną mi do oceny rozprawę doktorską należy podkreślić, iż jest ona rzetelnie zaplanowaną i wykonaną pracą. Badania zostały zrealizowane w jednym z najlepszych ośrodków w Polsce, zajmujących się diagnostyką dyskrazji plazmocytowych, pod kierunkiem wybitnego eksperta w tej dziedzinie, tj. Pana Dr hab. Ryszarda Drożdża. W recenzowanej dysertacji Doktorantka podjęła się bardzo istotnego i aktualnego nie tylko ze względów naukowych, ale też praktycznych, tematu, dotyczącego zagadnienia, związanego z grupą chorób, charakteryzujących się nowotworowym rozrostem plazmocytów, wykazując się przy tym znajomością warsztatu badawczego oraz umiejętnością interpretacji uzyskanych wyników. Prezentowaną pracę, która spełnia wymogi ustawowe, oceniam bardzo wysoko i przedkładam Radzie Dyscypliny Nauk o Zdrowiu Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum wniosek o nadanie Pani mgr Aleksandrze Maleszka stopnia naukowego doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu, w dyscyplinie nauki o zdrowiu.

Prof. dr hab. n. med. Barbara Mroczko

Kierownik Zakładu Diagnostyki Biochemicznej i
Zakładu Diagnostyki Chorób Neurozwyrodnieniowych
Uniwersytet Medyczny w Białymstoku