

AUTOREFERAT

1. Imię i nazwisko: Magdalena Krintus

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe/artystyczne – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.

2000 r. – magister analityki medycznej, Wydział Farmaceutyczny Akademii Medycznej w Bydgoszczy, kierunek Analityka Medyczna

2008 r. – doktor nauk medycznych, specjalność biologia medyczna, Wydział Lekarski., Collegium Medicum. Uniwersytet Mikołaja Kopernika. Rozprawa doktorska powstała w Katedrze i Zakładzie Diagnostyki Laboratoryjnej Collegium Medicum UMK

Tytuł rozprawy doktorskiej:

„Występowanie podwyższonego stężenia białka CRP u klinicznie zdrowych osób z normolipidemią”. Promotor: Grażyna Odrowąż-Sypniewska.

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych/artystycznych.

2004-2008 r. – studia doktoranckie w Katedrze i Zakładzie Diagnostyki Laboratoryjnej Akademii Medycznej w Bydgoszczy

2008-2012 r. – asystent w Katedrze Diagnostyki Laboratoryjnej, Wydział Farmaceutyczny, Collegium Medicum UMK w Bydgoszczy

od 2012 r. – adiunkt w Katedrze i Zakładzie Diagnostyki Laboratoryjnej, Wydział Farmaceutyczny, Collegium Medicum UMK w Bydgoszczy

2016-2017 r. – młodszy asystent w Zakładzie Diagnostyki Laboratoryjnej, Szpital Uniwersytecki nr. 1 im. dr. A. Jurasza w Bydgoszczy

4. Wykaz prac stanowiących osiągnięcie naukowe zgodnie z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.):

a) tytuł osiągnięcia naukowego

Wybrane biomarkery w diagnostyce i stratyfikacji ryzyka ostrych zespołów wieńcowych: aspekty analityczne i kliniczne.

Osiągnięcie naukowe zostało udokumentowane cyklem pięciu przedstawionych poniżej prac opublikowanych w recenzowanych czasopismach znajdujących się w bazie Journal Citation reports (JCR), cytowanych łącznie 69 razy o sumarycznym współczynniku oddziaływania **IF=17.718 oraz KBN/MNiSW= 175**. Wymienione poniżej prace powstały po uzyskaniu stopnia doktora nauk medycznych, specjalność biologia medyczna.

b) Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego:

1. **Krintus M**, Kozinski M, Boudry P, Capell NE, Köller U, Lackner K, Lefèvre G, Lennartz L, Lotz J, Herranz AM, Nybo M, Plebani M, Sandberg MB, Schratzberger W, Shih J, Skadberg Ø, Chargui AT, Zaninotto M, Sypniewska G. European multicenter analytical evaluation of the Abbott ARCHITECT STAT high sensitive troponin I immunoassay. Clin Chem Lab Med. 2014;52:1657-65. **IF 2.707, KBN/MNiSW: 35.00**

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: zbieraniu danych, wykonaniu oznaczeń laboratoryjnych, przeprowadzeniu analizy statystycznej, interpretacji uzyskanych wyników, analizie piśmiennictwa oraz przygotowaniu tekstu publikacji. Mój udział procentowy szacuję na 60%.

2. **Krintus M**, Kozinski M, Boudry P, Lackner K, Lefèvre G, Lennartz L, Lotz J, Manysiak S, Shih J, Skadberg Ø, Chargui AT, Sypniewska G. Defining Normality in a European Multi-national Cohort: Critical Factors Influencing the 99th Percentile Upper Reference Limit for High Sensitivity Cardiac Troponin I. Int J Cardiol. 2015; 187:256-263. **IF 4.638, KBN/MNiSW: 35.00**

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: opracowaniu projektu badania, zbieraniu danych, wykonaniu oznaczeń laboratoryjnych, przeprowadzeniu analizy statystycznej, interpretacji uzyskanych wyników, analizie piśmiennictwa oraz przygotowaniu tekstu publikacji. Mój udział procentowy szacuję na 70%.

3. **Krintus M**, Kozinski M, Fabiszak T, Kuligowska-Prusinska M, Laskowska E, Lennartz L, Nowak-Los L, Kubica J, Sypniewska G.

Impact of lipid markers and high-sensitivity C-reactive protein on the value of the 99th percentile upper reference limit for high-sensitivity cardiac troponin I. *Clin Chim Acta*. 2016;462:193-200. **IF 2.799, KBN/MNiSW: 40.00**

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: zbieraniu danych, wykonaniu oznaczeń laboratoryjnych, przeprowadzeniu analizy statystycznej, interpretacji uzyskanych wyników, analizie piśmiennictwa oraz przygotowaniu tekstu publikacji. Mój udział procentowy szacuję na 40%.

4. **Krintus M**, Kozinski M, Stefanska A, Sawicki M, Obonska K, Fabiszak T, Kubica J, Sypniewska G.

Value of C-reactive protein as a risk factor for acute coronary syndrome: a comparison with apolipoprotein concentrations and lipid profile. *Mediators Inflamm*. 2012;2012:419804. **IF 3.882, KBN/MNiSW: 20.00**

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: opracowaniu projektu badania, zbieraniu danych, wykonaniu oznaczeń laboratoryjnych, przeprowadzeniu analizy statystycznej, interpretacji uzyskanych wyników, analizie piśmiennictwa oraz przygotowaniu tekstu publikacji. Mój udział procentowy szacuję na 70%.

5. **Krintus M**, Kozinski M, Kubica J, Sypniewska G. Critical appraisal of inflammatory markers in cardiovascular risk stratification. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2014;51:263-79. **IF 3.692, KBN/MNiSW: 45.00**

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: opracowaniu projektu pracy, zbieraniu danych oraz analizie piśmiennictwa, przygotowaniu tekstu publikacji. Mój udział procentowy szacuje na 45%.

- oświadczenia współautorów o indywidualnym wkładzie autorskim znajdują się w załączniku nr 6

- kopie powyższych prac znajdują się w załączniku nr 5

c) omówienie celu naukowego ww. pracy/prac i osiągniętych wyników wraz z

omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.

Cel naukowy:

Prace stanowiące osiągnięcie naukowe dotyczyły zastosowania wybranych biomarkerów w diagnostyce i stratyfikacji ryzyka ostrych zespołów wieńcowych, z uwzględnieniem ich aspektów analitycznych jak i klinicznych.

1. Wstęp

Choroby sercowo-naczyniowe stanowią globalny problem zdrowotny, społeczny i ekonomiczny w krajach rozwiniętych. Pomimo ogromnego postępu technologicznego w medycynie, diagnostyce laboratoryjnej i farmakologii trendy epidemiologiczne dotyczące chorób sercowo-naczyniowych są niekorzystne i pozostają ogromnym wyzwaniem dla całego systemu służby zdrowia. Choroba niedokrwienna serca (ChNS) oraz jej kliniczna manifestacja obejmująca zarówno bezobjawowe niedokrwienie mięśnia sercowego i stabilną dławicę piersiową, jak i zawał serca, niewydolność serca i nagły zgon sercowy charakteryzują się dużą chorobowością i śmiertelnością.

Ostre zespoły wieńcowe (OZW) są bezpośrednio zagrażającą życiu konsekwencją zaostrzenia ChNS o wspólnym podłożu patofizjologicznym, którym jest pęknięcie lub erozja blaszki miażdżycowej, prowadząca do zakrzepicy i zatorowości dystalnej. Kliniczna klasyfikacja OZW obejmuje continuum zmian niedokrwiennych, od niestabilnej dławicy piersiowej (UA) z odwracalnym uszkodzeniem miokardium, poprzez ostry zawał mięśnia sercowego (AMI) z nieodwracalnym uszkodzeniem miokardium i zróżnicowanym obszarem martwicy. Wstępna klasyfikacja chorych z bólem wieńcowym i podejrzeniem OZW opiera się na zapisie EKG i pozwala na wyróżnienie dwóch kategorii klinicznych OZW:

-z przetrwałym uniesieniem odcinka ST (STE-ACS), który jest konsekwencją całkowitego zamknięcia światła tętnicy wieńcowej,

- bez przetrwałego uniesienia odcinka ST (NSTE-ACS)

Dalsze różnicowanie chorych z NSTE-ACS w celu rozpoznania lub wykluczenia zawału mięśnia sercowego bez uniesienia odcinka ST (NSTEMI) wymaga oznaczania biomarkerów sercowych, najlepiej sercowej troponiny I (cTnI) lub T (cTnT).

1.1 Definicja, charakterystyka oraz zastosowanie kliniczne biomarkerów

Termin „biomarker” odnosi się do szerokiej kategorii wskaźników medycznych, dających obiektywne przesłanki do oceny stanu zdrowia pacjenta, które mogą być zmierzone w sposób precyzyjny i powtarzalny [1]. Biomarker jest pojęciem stosunkowo nowym, w Słowniku Pojęć Medycznych (Medical Subject Headings [MeSH]), prowadzonym przez United States National Library of Medicine został umieszczony w 1989 roku. W 1998 roku Grupa Robocza ds. Biomarkerów Narodowych Instytutów Zdrowia (the National Institutes of Health [NIH]) zdefiniowała biomarker jako “cechę, którą można obiektywnie zmierzyć i ocenić jako wskaźnik prawidłowych procesów biologicznych, procesów patologicznych lub odpowiedzi organizmu na działania terapeutyczne” [2]. Wspólne przedsięwzięcie w sprawie bezpieczeństwa chemicznego Międzynarodowego Programu Bezpieczeństwa Chemicznego, kierowanego przez Światową Organizację Zdrowia (World Health Organization [WHO]) i Międzynarodową Organizację Pracy (the International Labor Organization [ILO]), zdefiniowało biomarker jako ‘każdą substancję, strukturę lub proces, który można zmierzyć w organizmie, oraz jego produkty i wpływ, albo przewidzieć występowanie zdarzenia lub choroby’ [3].

Idealny biomarker powinien posiadać następujące cechy: być szeroko dostępny, powtarzalny, szybki w oznaczaniu oraz stosunkowo tani. Zastosowanie kliniczne biomarkerów w praktyce klinicznej powinno natomiast umożliwiać: wczesne wykrycie bezobjawowej lub skapoobjawowej choroby, lub wykrycie zagrożenia wystąpienia tej choroby, różnicowanie stanu ostrego i przewlekłego, stratyfikację ryzyka, monitorowanie przebiegu choroby i odpowiedzi na leczenie oraz wybór odpowiedniej metody terapeutycznej.

1.2 Rola biomarkerów w OZW

W kontekście złożonych zmian leżących u podłoża OZW biomarkery mogą odzwierciedlać proces patofizjologiczny na każdym etapie od powstania blaszki miażdżycowej (LDL-cholesterol [LDL-C], białko C-reaktywne [CRP], fibrynogen), poprzez jej destabilizację (mieloperoksydaza [MPO]), pęknięcie, tworzenie zakrzepu, niedokrwienie, martwicę (cTnI, cTnT) i przebudowę lewej komory (peptyd natriuretyczny typu B [BNP] i NT-proBNP). Zgodnie z aktualnymi oczekiwaniami wynik oznaczenia biomarkerów w diagnostyce OZW powinien wpływać na postępowanie kliniczne, co dotyczy wcześniejszego rozpoznania uszkodzenia i/lub martwicy mięśnia sercowego oraz lepszej stratyfikacji ryzyka.

2. Troponiny sercowe w diagnostyce OZW

Troponiny sercowe odgrywają główną rolę w diagnostyce i stratyfikacji ryzyka u pacjentów z OZW. Troponiny są białkami drobnocząsteczkowymi regulującymi skurcz kardiomiocytów. Ze względu na wysoką dla miokardium czułość i swoistość troponiny sercowe są najbardziej preferowanymi i rekomendowanymi biomarkerami do rozpoznania zawału mięśnia sercowego oraz różnicowania między NSTEMI a UA. Oznaczanie sercowej troponiny I (cTnI) do diagnozy ostrego zawału mięśnia sercowego po raz pierwszy opisano w 1987 r. Poczynając od I Uniwersalnej Definicji Zawału Mięśnia Sercowego ogłoszonej w 2000 roku przez wspólne stanowisko European Society of Cardiology (ESC) oraz American College of Cardiology (ACC) troponiny sercowe sukcesywnie umacniają swoją kluczową rolę w rozpoznaniu zawału serca, czego dowodem jest trzecia już aktualizacja tej definicji z 2012 roku [4-6]. Zgodnie z aktualną definicją za rozpoznaniem ostrego zawału mięśnia sercowego przemawia wzrost i/lub spadek stężenia troponiny z co najmniej jedną wartością przekraczającą próg decyzyjny, przy współistnieniu objawów klinicznych niedokrwienia serca. Jako wartość decyzyjną dla rozpoznania AMI przyjmuje się stężenie troponiny przekraczające 99. percentyl stężeń w zdrowej populacji referencyjnej z zachowaniem optymalnej precyzji pomiaru, określonej współczynnikiem zmienności (CV) <10% [6]. Rekomendacje Polskiego Towarzystwa Diagnostyki Laboratoryjnej bardzo dokładnie omawiają zagadnienia dotyczące roli markerów biochemicznych, ze szczególnym uwzględnieniem sercowej troponiny, w świetle uniwersalnej definicji zawału mięśnia sercowego [7].

2.1 Troponiny sercowe oznaczane metodami o wysokiej czułości (hs-cTn)

Głównym ograniczeniem dotyczącym zastosowania klinicznego troponin oznaczanych standardowymi testami jest ich niska czułość w pierwszych godzinach od wystąpienia bólu dławicowego. Opóźniony wzrost ich stężenia we krwi obwodowej wymaga dodatkowego oznaczania po upływie 6-9 godzin od przyjęcia pacjenta i może mieć niekorzystne implikacje kliniczne i terapeutyczne.

Obserwowany w ciągu ostatnich kilku lat postęp technologiczny w diagnostyce *in vitro* (IVD) przyczynił się do ulepszenia metod służących do wykrywania cTn, co doprowadziło do pojawienia się wysokoczulych testów do oznaczania stężenia cTnI i cTnT. Pierwszy wysokoczulý test do oznaczania troponiny T został wprowadzony do praktyki

klinicznej w Europie w 2010 roku (hs-cTnT, Roche), nieco później w 2013 roku został wprowadzony test do oznaczania hs-cTnI przez firmę Abbott. Aktualnie stosowane w praktyce klinicznej metody analityczne pozwalają na wykrycie nawet minimalnej martwicy kardiomiocytów (<1g). **W pierwszej pracy stanowiącej osiągnięcie naukowe** podjęłam wraz ze współautorami próbę analitycznej oceny nowego testu do oznaczania hs-cTnI na analizatorach Abbott ARCHITECT i2000_{SR}/i1000_{SR}. Niewątpliwą zaletą tego badania był jego wielośrodkowy charakter obejmujący laboratoria kliniczne z 9 europejskich ośrodków naukowych (Austrii, Belgii, Danii, Francji, Niemiec, Włoch, Norwegii, Polski i Hiszpanii). Ze względu na szeroki wybór testów do oznaczania hs-cTnI, oferowany przez różnych producentów IVD, niezwykle ważna jest dokładna walidacja metody i ocena analityczna determinująca ich późniejsze zastosowanie kliniczne, która jest zgodna z aktualnymi wytycznymi definiującymi wysokoczułe testy do oznaczania stężenia cTnI.

W 2013 roku Międzynarodowe Towarzystwo Chemii Klinicznej i Medycyny Laboratoryjnej (IFCC: International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine) opublikowało rekomendacje charakteryzujące wysokoczułe testy do oznaczania stężenia troponiny [8]. Zgodnie z tymi rekomendacjami wysokoczułe testy do oznaczania troponin powinny charakteryzować się m.im: wyższą czułością od standardowych testów, wykrywalnością u zdrowych osób >50%, wysoką precyzją określoną współczynnikiem zmienności (CV) <10%, dokładnie określonym limitem wartości dla próby ślepej (LoB), limitem detekcji (LoD) oraz limitem oznaczalności (LoQ), dokładnie zweryfikowaną wartością 99.percentyla w zdrowej populacji referencyjnej oraz brakiem interferencji. Ze względu na znaczne różnice w wartości 99.percentyla związane z płcią, sugeruje się ich wyznaczenie dla obu płci. Wyniki należy przedstawiać w ng/L.

2.1.1. Weryfikacja cech analitycznych testu do oznaczania hs-cTnI.

W pierwszej pracy stanowiącej osiągnięcie naukowe dokonano dogłębnej weryfikacji powyższych rekomendacji w odniesieniu do testu Abbott ARCHITECT *STAT* high sensitive troponin I.

a. Ocena precyzji analitycznej

Całkowita nieprecyzyjność testu wahała się od 3.3% do 8.9% dla surowicy kontrolnej o niskim stężeniu hs-cTnI, 2.0% do 3.5% dla surowicy kontrolnej o średnim stężeniu i 1.5% do 5.2% dla surowicy kontrolnej o wysokim stężeniu. Całkowity

międzylaboratoryjny CV dla testu mieścił się poniżej 10% dla próbek o stężeniach hs-cTnI w przedziale od 18.4 do 15 912.3 ng/L, co świadczy o wysokiej precyzji testu w szerokim przedziale stężeń. Najniższe stężenie hs-cTnI odpowiadające 10% CV wynosiło 5.6 ng/L. Przy 20%; 10% i 5% CV odpowiednio hs-cTnI 2.2, 3.6 i 9 ng/L. Z kolei w badaniu przeprowadzonym przez Collinsona i wsp., całkowita nieprecyzyjność testu do oznaczania hs-cTnI wahała się od 4% do 12.1% z 10% CV przy stężeniu 7.3 ng/L [9]. Są to wartości wyższe niż podawane w ulotce producenta (10% CV przy stężeniu hs-cTnI 4.7 ng/L) [10]. Natomiast test do oznaczania hs-cTnI charakteryzował się nieprecyzyjnością wyrażoną 10% CV przy stężeniu 13 ng/L [11].

- b. Weryfikacja limitu dla próby ślepej (LoB), limitu detekcji (LoD) i limitu oznaczalności (LoQ).

W naszym wielośrodkowym europejskim badaniu po zweryfikowaniu otrzymaliśmy:

LoB w zakresie 0.7-1.3 ng/L

LoD w zakresie 1.1-1.9 ng/L

LoQ \leq 10 ng/L przy 10%CV

- c. Ocena wykrywalności u zdrowych osób

Przy zweryfikowanym LoD cTnI była wykrywalna ($>$ LoD 1.1 ng/L) u 75% osób z populacji referencyjnej, natomiast przy LoD 1.9 ng/L była wykrywalna u 57% osób. Z kolei w badaniu Collinsona, hs-cTnI była wykrywalna u 99.5% osób stanowiących populację referencyjną [9].

- d. Wpływ interferencji

Hemoliza, hiperbilirubinemia, lipemia, przeciwciała heterofilne, autoprzeciwciała oraz przechowywanie próbek mogą potencjalnie wpływać na wynik stężenia hs-cTnI powodując fałszywie dodatnie lub fałszywie ujemne wyniki. Weryfikacja interferencji w naszym wielośrodkowym badaniu wykazała: brak interferencji przy stężeniu bilirubiny do 20 mg/dl (zmiana w stężeniu hs-cTnI $<$ 10%), brak wpływu hemolizy przy stężeniu hemoglobiny do 860 mg/dl (średnia zmiana stężenia hs-cTnI $<$ 3%), brak wpływu lipemii przy stężeniu triglicerydów $>$ 500 mg/dl. Powyższe obserwacje,

przeprowadzone również wcześniej przez Koerbina i wsp. [12] pozwalają stwierdzić, że test ten nie jest wrażliwy na interferencje nawet w zakresie niskich stężeń, bliskich wartości decyzyjnej dla rozpoznania ostrego zawału mięśnia sercowego. W przypadku hs-cTnT odnotowano istotny klinicznie wpływ hemolizy na stężenie troponiny w próbce (>20% spadek stężenia) w przedziale stężeń hs-cTnT bliskich wartościom 99-tego percentyla [13].

- e. Wyznaczenie wartości 99.percentyla w przypuszczalnie zdrowej, europejskiej populacji referencyjnej

Zgodnie z rekomendacjami IFCC do wyznaczenia wartości 99.percentyla wymagana jest populacja co najmniej 300 osób (w przypadku podziału na płeć, co najmniej 300 osób jednej płci). Drugim warunkiem jest wybór odpowiednich metod statystycznych (metody nieparametryczne) oraz eliminacja wyników odstających. Wyznaczenie 99.percentyla stężeń hs-cTnI jest kluczowym elementem procesu walidacji metody i niewątpliwie najważniejszym z klinicznego punktu widzenia. W naszym wielośrodkowym badaniu populację referencyjną stanowiło 1769 osób w wieku 18-91 lat, mediana wieku wynosiła 49 lat (rozstęp międzykwartyłowy 18-60 lat). Wartości 99.percentyla wyliczono za pomocą testów nieparametrycznych. Wartości 99.percentyla otrzymane w europejskiej populacji przedstawiono w Tabeli 1.

Tabela 1. Wartości 99.percentyla stężeń hs-cTnI w przypuszczalnie zdrowej europejskiej populacji referencyjnej.

Przypuszczalnie zdrowe osoby z populacji referencyjnej	Liczba osób	99^{ty} percentyl (90% CI) [ng/L]
Ogółem	1769	19.3 (14-25)
Kobiety	993	11.4 (10-15)
Mężczyźni	776	27 (20-67)

Zaobserwowano ponad dwukrotnie wyższą wartość 99.percentyla hs-cTnI u mężczyzn w porównaniu do grupy kobiet. Mężczyźni charakteryzowali się ponadto wyższą medianą stężeń hs-cTnI (2.7 vs. 1.8 ng/L, $p < 0.0001$). Wartości 99.percentyla w europejskiej populacji referencyjnej były niższe niż zaobserwowane w amerykańskiej populacji, jednak w obu

populacjach zaobserwowano znaczne różnice dotyczące wartości 99.percentyla u kobiet i mężczyzn. Specyficzne dla obu płci wartości odcięcia są rekomendowane w III Uniwersalnej Definicji Zawału, jednak ta koncepcja wymaga dalszych badań klinicznych.

W niniejszej pracy stanowiącej pierwsze osiągnięcie naukowe dokonano również innych, ważnych z analitycznego punktu widzenia weryfikacji metody zgodnie z wytycznymi zawartymi w dokumencie EP6-A CLSI [14]. Zbadano wpływ rozcieńczenia próbek na wynik pomiaru hs-cTnI. Nie zaobserwowano istotnego odchylenia w liniowości dla stężeń powyżej 50000 ng/L, co potwierdza zdolność do uzyskania wiarygodnych wyników pomiarów przy użyciu manualnych lub zautomatyzowanych procedur rozcieńczania. Dokonano również oceny wpływu użytych do otrzymania osocza antykoagulantów (EDTA, heparyna litowa) na wynik stężenia hs-cTnI w porównaniu do wyników otrzymanych w surowicy dla tego samego pacjenta. Obserwacje poczynione w naszym badaniu wykazały niewielkie, ale statystycznie istotne różnice pomiędzy stężeniem hs-cTnI w osoczu heparynizowanym a osoczu EDTA oraz pomiędzy osoczem heparynizowanym a surowicą. Różnice w stężeniu hs-cTnI oznaczone w osoczu EDTA i w surowicy nie były istotne statystycznie. Aspekt ten wymaga dalszych badań i walidacji, jednak zgodnie z aktualnymi zaleceniami zarówno surowica i osocze (najlepiej heparynizowane) są uważane za właściwy materiał do oznaczania hs-cTnI. Biorąc pod uwagę powyższe wątpliwości należy jednak seryjne pomiary u danego pacjenta wykonywać z jednego rodzaju materiału w celu zminimalizowania zmienności wynikającej z zastosowania różnych macierzy [15]. **W wielośrodkowym badaniu stanowiącym pierwsze osiągnięcie naukowe** nie wykazaliśmy efektu przeniesienia (carryover), który może być źródłem fałszywie dodatnich wyników hs-cTn i był wcześniej obserwowany w innych badaniach [16]. Dużym wyzwaniem analitycznym było porównanie testu o wysokiej czułości (hs-cTnI) z dotychczas stosowanym standardowym testem (cTnI), ze względu na ponad 10-krotnie niższy limit detekcji oraz wyraźnie ulepszoną precyzję przy wartości 99.percentyla stężeń hs-cTnI. Co najważniejsze, otrzymaliśmy 95% zgodność wyników oznaczeń uzyskanych obiema metodami. Na podstawie naszych spostrzeżeń wydaje się, że metody te nie mogą być stosowane zamiennie, jednak doskonała zgodność wyników sięgająca 95% umożliwia bezpieczne przejście z dotychczas stosowanej metody na metodę o wysokiej czułości, nie pociągając za sobą niekorzystnych implikacji klinicznych.

Podsumowując moje pierwsze osiągnięcie naukowe, wynikające z wielośrodkowej współpracy, na podstawie niezależnych obserwacji przeprowadzonych w 9 krajach wykazano,

że test do oznaczania hs-cTnI na analizatorach Abbott ARCHITECT spełnia rekomendacje wymagane dla testów o wysokiej czułości (hs-cTn) i posiada doskonałą precyzję w zakresie niskich stężeń, również poniżej wartości 99.percentyla. Ponadto, w oparciu o dużą europejską populację referencyjną wyznaczyłam wartość 99.percentyla, zarówno ogólną, jak i specyficzną dla obu płci. Wyniki tego badania potwierdziły, że test do oznaczania hs-cTnI jest czułym i precyzyjnym narzędziem diagnostycznym, co ułatwia jego zastosowanie w codziennej praktyce klinicznej.

2.2 99.percentyl górnego zakresu referencyjnego (URL) jako krytyczny element definicji zawału oraz czynniki determinujące jego wartość w populacji referencyjnej

99.percentyl górnego zakresu referencyjnego (URL) stężeń troponiny, wyznaczony w zdrowej populacji referencyjnej stanowi kluczowy element Uniwersalnej Definicji Zawału Mięśnia Sercowego i jednocześnie diagnostyczny punkt odcięcia dla zawału. Zgodnie z powyższym do rozpoznania AMI, oprócz klinicznych dowodów niedokrwienia, niezbędne jest stwierdzenie stężenia troponiny powyżej wartości 99.percentyla wartości referencyjnych dla osób zdrowych, przy założeniu nieprecyzyjności pomiaru $<10\%$ CV [6]. Pewnym utrudnieniem w diagnostyce OZW jest brak harmonizacji oznaczeń troponiny i brak ogólnego protokołu dotyczącego selekcji zdrowej populacji referencyjnej do wyznaczenia wartości krytycznego punktu odcięcia, co w efekcie przyczynia się do dużej różnorodności dostępnych wartości decyzyjnych, w zależności od producenta testu, rodzaju platformy analitycznej, bądź wyboru populacji referencyjnej. Aktualnie brak jednoznacznych wytycznych dotyczących wyboru zdrowej populacji referencyjnej. Proponowana selekcja opiera się m.in. na zastosowaniu: kwestionariusza, badań laboratoryjnych z użyciem biomarkerów do oceny ryzyka ChNS, badań obrazowych i innych testów diagnostycznych do oceny stanu zdrowia osób stanowiących populację referencyjną [17-20]. Grupa robocza IFCC rekomenduje ponadto włączenie minimum 300 osób obu płci oraz użycie odpowiednich metod statystycznych do wyznaczenia 99. percentyla URL. Kwestia ta nabiera szczególnego znaczenia po wprowadzeniu do praktyki klinicznej testów o wysokiej czułości, które pozwalają na wykrycie stężenia hs-cTn niemal u każdego zdrowego człowieka. Warto tutaj podkreślić, że nawet niewielki wzrost stężenia cTn może mieć istotne znaczenie w prognozowaniu niekorzystnych zdarzeń sercowo-naczyniowych, wskazując na wagę problemu dotyczącego rzetelnego wyznaczenia wartości decyzyjnych dla troponiny w zdrowej populacji referencyjnej [21]. **W pracy stanowiącej drugie osiągnięcie naukowe**

podjęłam próbę wyznaczenia wartości 99.percentyla dla hs-cTnI oraz identyfikacji czynników determinujących jego wartość, na podstawie wyników badań przeprowadzonych w 9 europejskich krajach. Badanie to zostało zaprojektowane jako wielośrodkowe, kohortowe badanie obserwacyjne. Próbkę surowicy oraz osocza pobrano u 1368 osób z 9 krajów, deklarujących dobry stan zdrowia na podstawie kwestionariusza, stanowiących wyjściową, przypuszczalnie zdrową populację referencyjną do wyznaczenia 99.percentyla stężeń hs-cTnI. Kryteria włączenia do badania obejmowały ponadto: brak chorób sercowo-naczyniowych w wywiadzie, niestosowanie leczenia i brak interwencji kardiologicznych, nadciśnienia oraz cukrzycy. Dodatkowe kryteria wykluczenia z badania obejmowały: ciążę, aktywną infekcję oraz przewlekłe choroby o podłożu zapalnym. Dalszą selekcję w kierunku zdefiniowania zdrowej populacji referencyjnej przeprowadzono przy użyciu biochemicznych markerów laboratoryjnych: peptydu natriuretycznego typu B (BNP) < 35 pg/ml dla obu płci [22], hemoglobiny glikowanej (HbA1c) < 48mmol/l (<6.5%) [23] oraz współczynnika przesączania kłębuszkowego (eGFR) > 60 ml/min/1.73m² [24]. Przy zastosowaniu oznaczeń tych biomarkerów udało się progresywnie wykluczyć osoby obarczone ryzykiem niewydolności serca, cukrzycy oraz umiarkowanej do ciężkiej niewydolności nerek. Ponadto, zbadano wpływ dyslipidemii na wartość 99.percentyla w przypuszczalnie zdrowej i zdrowej populacji referencyjnej. Wartości 99.percentyla w przypuszczalnie zdrowej (n=1368) oraz wyselekcjonowanej zdrowej (n=634) populacji wyznaczono przy użyciu dwóch rekomendowanych przez CLSI metod w tym nieparametrycznej metody percentylowej i metody robust.

W wielośrodkowym badaniu stanowiącym drugie osiągnięcie naukowe wykazałam wpływ wielu czynników na wartość 99.percentyla hs-cTnI. Ponadto, wykazałam że zastosowanie różnych warunków selekcji oraz dwóch niezależnych metod statystycznych wpływa na dużą różnorodność otrzymanych wartości 99.percentyla, pomimo zastosowania tego samego testu o wysokiej czułości (hs-cTnI), tej samej platformy analitycznej i w tej samej wyjściowej populacji referencyjnej. Płeć męska, BNP, HbA1c oraz palenie istotnie determinowały stężenia hs-cTnI w przypuszczalnie zdrowej, wyjściowej populacji referencyjnej. Najsilniejszym czynnikiem determinującym wartość 99.percentyla było zastosowanie kryterium selekcji opartego na stężeniu BNP.

Niewątpliwą zaletą **badania stanowiącego drugie osiągnięcie naukowe** był jego wielośrodkowy charakter oraz liczba przebadanych osób stanowiących wyselekcjonowaną

zdrową populację referencyjną. Zgodnie z moją najlepszą wiedzą, jest to aktualnie największa wyselekcjonowana zdrowa populacja referencyjna do wyznaczenia 99.percentyla URL dla hs-cTnI. Ponadto, w żadnym z wcześniejszych badań nie zastosowano oznaczeń HbA1c w celu wykluczenia osób obciążonych ryzykiem cukrzycy. Wartość **pracy stanowiącej drugie osiągnięcie naukowe** podnosi również zastosowanie dwóch rekomendowanych metod statystycznych do wyznaczenia 99.percentyla URL oraz zbadanie wpływu innych czynników na zmienność stężeń hs-cTnI za pomocą regresji wielorakiej, która powinna poprzedzać wszystkie analizy prowadzące do wyznaczenia 99.percentyla URL w populacji referencyjnej.

2.2.1 Wartości 99.percentyla w przypuszczalnie zdrowej i wyselekcjonowanej zdrowej europejskiej populacji referencyjnej.

Wyznaczona w **pracy stanowiącej drugie osiągnięcie naukowe** wartość 99.percentyla stężeń hs-cTnI w wyjściowej, przypuszczalnie zdrowej populacji (n=1368) była znacznie niższa niż podawana w ulotce producenta (14.1 vs 26.2 ng/l) pomimo zastosowania tego samego testu, platformy analitycznej, metody statystycznej i w porównywalnej liczebnie populacji. Dalsza selekcja w celu zdefiniowania zdrowej populacji referencyjnej (n=634), oparta na badaniach laboratoryjnych z użyciem biomarkerów prowadziła do istotnego obniżenia wartości 99.percentyla (11.2 oraz 7.1 ng/l przy zastosowaniu odpowiednio metody nieparametrycznej percentylowej i metody robust). Zaobserwowano istotnie niższe wartości 99.percentyla u kobiet w porównaniu do mężczyzn. Spośród wszystkich parametrów BNP miało najsilniejszy wpływ na wartość 99.percentyla URL. Nie wykazano dalszego obniżenia wartości 99.percentyla po wykluczeniu osób z dyslipidemią. Palenie okazało się istotnym czynnikiem determinującym wartość 99.percentyla. Co jednak bardzo interesujące, w wyselekcjonowanej zdrowej populacji wartości 99.percentyla były zbliżone i nie różniły się istotnie pomiędzy grupami wiekowymi.

2.2.2. Czynniki wpływające na zmienność stężenia hs-cTnI.

W **pracy stanowiącej drugie osiągnięcie naukowe** zidentyfikowano i zbadano wpływ niektórych czynników na stężenie hs-cTnI. Płeć męska oraz palenie najsilniej spośród tradycyjnych czynników ryzyka chorób sercowo-naczyniowych wpływały na zmienność stężeń hs-cTnI. Nieco słabszy wpływ zaobserwowano w przypadku wieku, co pozostaje w zgodzie z doniesieniami innych [19], ale nie wszystkich autorów [20,25,26]. Spośród

oznaczanych biomarkerów, po uwzględnieniu wpływu wieku, płci i dyslipidemii jedynie BNP istotnie wpływało na zmienność stężeń hs-cTnI w przypuszczalnie zdrowej populacji. Z kolei w zdrowej populacji referencyjnej, po uwzględnieniu wpływu wieku i płci jedynie stężenie HbA1c wpływało na zmienność stężeń hs-cTnI. Nie zaobserwowano wpływu BMI na zmienność stężeń hs-cTnI.

Podsumowując, wyniki **niniejszej pracy** wyraźnie wskazują, że wybór i selekcja populacji referencyjnej ma krytyczny wpływ na wartość 99.percentyla URL hs-cTnI. Ponadto, podkreślają potrzebę przeprowadzenia dalszych badań klinicznych w celu opracowania optymalnego protokołu dotyczącego wyboru i selekcji zdrowej populacji referencyjnej oraz ustalenia optymalnego punktu odcięcia dla stężenia hs-cTnI do rozpoznania zawału. Do czasu gdy takie badania zostaną przeprowadzone, w szczególności u pacjentów z granicznymi wartościami stężeń hs-cTnI należałoby oceniać łącznie obraz kliniczny i zapis EKG z dynamiką zmian stężeń hs-cTnI niż opierać się na wyniku pojedynczego pomiaru.

2.2.3. Wpływ parametrów lipidowych na stężenie hs-cTnI w surowicy oraz wartość 99.percentyla hs-cTnI.

W pracy stanowiącej trzecie osiągnięcie naukowe zbadalam ponadto wpływ parametrów lipidowych na stężenie hs-cTnI w surowicy oraz na wartość 99.percentyla w przypuszczalnie zdrowej populacji oraz w wyselekcjonowanej zdrowej populacji referencyjnej. W niniejszej pracy wykazałam, że osoby z wykrywalnymi stężeniami hs-cTnI (stężenie hs-cTnI powyżej limitu detekcji) charakteryzowały się większą częstością występowania podwyższonych wartości LDL-cholesterolu (LDL-C) (60% vs. 46%; $p=0.002$), apolipoproteiny B (73% vs. 61%; $p=0.008$), apoB:apoAI (53% vs. 40%; $p=0.005$) oraz lipoproteiny (a) (15% vs. 7%; $p=0.015$) w porównaniu do osób z niewykrywalnymi stężeniami hs-cTnI. Te spostrzeżenia zostały potwierdzone również w zdrowej kohorcie. Analiza korelacji przeprowadzona w przypuszczalnie zdrowej populacji oraz w zdrowej wyselekcjonowanej populacji wykazała istnienie słabych, ale istotnych statystycznie zależności pomiędzy stężeniem hs-cTnI w surowicy a wiekiem, BMI, stężeniem HbA1c, wartością eGFR oraz stężeniem parametrów lipidowych w surowicy, z wyjątkiem Lp(a). Zarówno analiza jednoczynnikowa, jak i wieloczynnikowa wykazały, że wskaźnik aterogenności apoB:apoAI oraz w mniejszym stopniu inne parametry lipidowe, ale nie CRP były istotnie związane ze stężeniem hs-cTnI w surowicy.

W pracy stanowiącej trzecie osiągnięcie naukowe wyznaczono również wartości 99.percentyla hs-cTnI zarówno w przypuszczalnie zdrowej populacji, jak i zdrowej wyselekcjonowanej populacji referencyjnej. Wartość 99.percentyla URL (z 90% CI) dla hs-cTnI w surowicy wyniosła dla obu płci 7.5 (6.3-8.6) ng/L i była wyższa u mężczyzn w porównaniu do kobiet (7.2 [6.5-8.0] vs. 6.9 [5.2-8.4] ng/L). Co najważniejsze, wykluczenie z populacji referencyjnej osób z podwyższonym apoB:apoAI i apoB obniżyło wyznaczoną wartość 99.percentyla o odpowiednio 12.9% (z 6.2 ng/L do 5.4 ng/L) i 14.5% (z 6.2 ng/L do 5.3 ng/L).

Głównym aspektem **pracy stanowiącej trzecie osiągnięcie naukowe**, zasługującym na podkreślenie, było wykazanie że aterogenne parametry lipidowe, a zwłaszcza apoB i wskaźnik apoB:apoAI wpływają zarówno na stężenie hs-cTnI w surowicy jak i na wartość wyznaczonego 99.percentyla. Potwierdza to wstępne wyniki uzyskane w poprzedniej pracy w której sugerowano, że dyslipidemia może być związana z podwyższonymi stężeniami hs-cTnI w przypuszczalnie zdrowej europejskiej populacji. **W niniejszej pracy** parametrem lipidowym najsilniej determinującym stężenie i wartość 99.percentyla hs-cTnI było stężenie apoB oraz wartość wskaźnika apoB:apoAI. Nadrzędna rola apoB:apoAI w prognozowaniu ryzyka zawału została wykazana w dużych, wieloośrodkowych badaniach tj.: INTERHEART [27,28], AMORIS [29] oraz meta-analizie przeprowadzonej przez Emerging Risk Factors Collaboration [30]. Zarówno obserwacje poczynione w tych badaniach, jak i w mojej pracy mogą być wytłumaczone tym, że apoB może być rozpatrywane jako pośredni parametr odzwierciedlający stężenie wszystkich aterogennych lipoprotein, a z kolei apoAI stanowi główne białko w cząsteczce HDL, która bierze udział w zwrotnym transporcie cholesterolu i ma uzasadnioną rolę w zapobieganiu progresji miażdżycy. Sugeruje się, że stężenie apoB we wszystkich aterogennych cząsteczkach lipidowych może być lepszym markerem ryzyka niż stężenie TC i LDL-C. Pomimo udokumentowanej roli Lp(a) oraz CRP w stratyfikacji ryzyka sercowo-naczyniowego, nie udało się wykazać związku pomiędzy stężeniem tych biomarkerów, a stężeniem hs-cTnI w surowicy. Również zastosowanie kryteriów selekcji opartych na stężeniu tych biomarkerów nie miało wpływu na końcową wartość 99.percentyla hs-cTnI. Biorąc jednak pod uwagę podwyższone stężenie hs-cTnI u osób z dyslipidemią nasuwa się hipoteza, że za ten stan odpowiada obecność subklinicznych zmian miażdżycowych. Pozostaje to w zgodzie z wynikami badania Segre i wsp., którzy wykazali niedawno, że stężenie cTnI, ale nie BNP, mieloperoksydazy, nitrotyrozyny lub utlenionych

LDL było związane z udokumentowaną angiograficznie przewlekłą ChNS u 95 pacjentów z cukrzycą [31].

W pracy stanowiącej trzecie osiągnięcie naukowe po raz kolejny wykazano, że zastosowanie różnych kryteriów selekcji populacji referencyjnej oraz metod statystycznych może wpływać na różnorodność otrzymanych wartości 99.percentyla hs-cTnI. Potwierdzono również obserwacje dokonane w **pierwszym i drugim osiągnięciu naukowym** dotyczące wyznaczenia odrębnych wartości decyzyjnych dla kobiet i mężczyzn. Podkreśla to potrzebę stworzenia i zastosowania uniwersalnego protokołu do wyznaczenia 99.percentyla URL dla hs-cTn.

Podsumowując **trzecie osiągnięcie naukowe**, przeprowadzone badanie wykazało, że aterogenne parametry lipidowe, a w szczególności apoB i apoB:apoAI, lecz nie CRP, mogą istotnie determinować stężenie hs-cTnI w surowicy i wpływać na wartość 99.percentyla URL.

3. CRP w diagnostyce i stratyfikacji ryzyka OZW.

CRP jest najlepiej poznanym białkiem ostrej fazy o udokumentowanej roli w diagnostyce, stratyfikacji ryzyka i monitorowaniu przebiegu infekcji, procesów zapalnych oraz związanych z martwicą [32]. Jest czułym, ale nieswoistym biomarkerem, dlatego jego podwyższone wartości oraz potencjalną przydatność diagnostyczną należy zawsze rozpatrywać w kontekście klinicznym. U pacjentów z AMI, stężenia CRP wzrastają w ciągu 4-6 godzin od wystąpienia objawów, osiągając maksymalne stężenie po 48-96 godzinach, a normalizacja następuje po upływie 7-10 dni od zdarzenia [33]. W odniesieniu do OZW rekomenduje się użycie testów III generacji do oznaczania CRP, o zwiększonej czułości diagnostycznej (hs-CRP) i nieprecyzyjności rzędu 5-10% w zakresie prawidłowych wartości.

Podwyższone stężenie CRP u pacjentów z OZW jest związane z występowaniem złożonych, narażonych na pęknięcie blaszek miażdżycowych. Ponadto wzrost stężenia CRP może odzwierciedlać proces zapalny przebiegający w blaszce miażdżycowej lub wskazywać na uszkodzenie ścian tętnic wieńcowych po zabiegach inwazyjnych. Bez względu na związek przyczynowy, podwyższone stężenia CRP są związane ze śmiertelnością w OZW, w mniejszym stopniu z ponownym wystąpieniem AMI. Pomimo, że dowody wskazują na brak przydatności tego biomarkera do rozpoznania OZW, zarówno w STEMI, jak i w NSTEMI,

CRP może być przydatne w stratyfikacji ryzyka podczas ostrej fazy choroby. Co interesujące, zwiększone stężenia CRP obserwuje się u pacjentów z OZW w czasie do 6 godzin od wystąpienia objawów, co może sugerować, że zmiany te nie są związane z następującym procesem martwicy kardiomiocytów, lecz są wywołane istnieniem subklinicznej reakcji zapalnej poprzedzającej OZW. Ponadto, CRP koreluje z obszarem zawału i może być istotnym predykatorem wystąpienia komplikacji w obserwacji krótko i długoterminowej w następstwie OZW. U pacjentów z niestabilną dławicą piersiową i zawałem serca podwyższone stężenie CRP oznacza gorsze rokowanie i ryzyko wystąpienia powikłań w czasie hospitalizacji, jak i w obserwacji 6-12 miesięcznej [34]. Wartość dodana i uzupełniająca tego biomarkera w klinicznych skalach ryzyka pozostaje jednak niejednoznaczna.

3.1 Porównanie wartości diagnostycznej CRP, profilu lipidowego oraz apolipoprotein u pacjentów z OZW.

Zgodnie z aktualną wiedzą proces miażdżycowy ma charakter wieloczynnikowy i łączy patomechanizm aktywacji reakcji zapalnej z zaburzeniami lipidowymi, prowadzącymi do powstania niestabilnej blaszki miażdżycowej, a ostatecznie OZW. Spośród najważniejszych czynników ryzyka, poza tradycyjnymi, markery zapalne i lipidowe odgrywają kluczową rolę w patomechanizmie miażdżycy i mogą być rozpatrywane również w kontekście zmian prowadzących do OZW.

W pracy stanowiącej **czwarte osiągnięcie naukowe** podjęłam się próby oceny wartości diagnostycznej CRP jako czynnika ryzyka w OZW oraz porównania zależności pomiędzy stężeniem tego biomarkera a innymi tradycyjnymi i lipidowymi czynnikami ryzyka chorób sercowo-naczyniowych. Grupę badaną stanowiła wyselekcjonowana grupa 220 pacjentów (91 kobiet i 129 mężczyzn w wieku 64 ± 12 lat) z OZW, u których czas od wystąpienia bólu dławicowego do momentu przyjęcia do szpitala nie przekroczył 6 godzin. Pacjenci zostali podzieleni na 3 grupy uwzględniające ostateczne rozpoznanie: UA (n=96), NSTEMI (n=57) i STEMI (n=67). Grupę porównawczą stanowiło 116 zdrowych osób (61 mężczyzn i 55 kobiet w wieku 52 ± 9 lat). Próbkę krwi do badań zostały pobrane od pacjentów z OZW przy przyjęciu do szpitala, natomiast w grupie kontrolnej rano na czczo. W surowicy krwi wykonano oznaczenia stężenia troponiny, CRP (metodą o wysokiej czułości), cholesterolu całkowitego (TC), cholesterolu HDL (HDL-C), cholesterolu LDL

(LDL-C), triglicerydów (TG) oraz apolipoproteiny B (apoB) i apolipoproteiny AI (apoAI). Ponadto obliczono wskaźniki aterogenności: TC:HDL-C, TG:HDL-C i apoB:apoAI. Na podstawie przeprowadzonej analizy statystycznej zaobserwowano, że pacjenci z OZW charakteryzowali się ponad czterokrotnie wyższą medianą stężeń CRP przy przyjęciu w porównaniu do zdrowych osób. Najwyższe stężenie CRP wykazano u pacjentów z ostrym zawałem, zarówno STEMI jak i NSTEMI w porównaniu do mediany stężeń CRP u pacjentów z UA. Analiza korelacji u pacjentów z OZW wykazała istnienie słabych, ale istotnych statystycznie zależności pomiędzy stężeniem tego biomarkera a wartością wskaźników aterogenności: apoB:apoAI ($R=0.16$; $p=0.02$), TG:HDL-C ($R=0.15$; $p=0.02$), LDL-C:HDL-C ($R=0.15$; $p=0.02$) i TC:HDL-C ($R=0.14$; $p=0.03$). Ponadto w grupie badanej CRP korelowało ujemnie ze stężeniem HDL-C ($R=-0.14$; $p=0.04$). W grupie kontrolnej nie zaobserwowano żadnych istotnych statystycznie zależności pomiędzy stężeniem CRP a parametrami lipidowymi.

W pracy omawianej pracy określono również prawdopodobieństwo wystąpienia OZW w zależności od tradycyjnych czynników ryzyka i wyjściowego stężenia wybranych biomarkerów. W subanalizie ograniczonej do wpływu tradycyjnych czynników ryzyka, iloraz szans (OR) był najwyższy dla nadciśnienia (OR 12.9; 95%CI 6.-24.9) i kolejno dla wieku (5.49; 95% CI 3.36-8.97) oraz dyslipidemii (OR 4.98; 2.92-8.53). Prawdopodobieństwo wystąpienia OZW w zależności od stężenia pozostałych parametrów laboratoryjnych przedstawiono za pomocą regresji logistycznej, po uwzględnieniu kolejno wpływu wieku, płci oraz palenia. Stężenie CRP przy przyjęciu, było najsilniejszym istotnym statystycznie predyktorem OZW spośród badanych biomarkerów (OR 1.9 dla wzrostu stężenia CRP o 1 mg/L; 95% CI 1.34-2.89) i tłumaczyło ponad 90% zmienności dla modelu. Analiza krzywych ROC przeprowadzona w niniejszej pracy potwierdziła wyniki uzyskane za pomocą regresji logistycznej. CRP charakteryzowało się najlepszą mocą dyskryminacyjną, co wyrażono wielkością pola pod krzywą (AUC=0.80) w porównaniu do innych zmiennych: TC:HDL-C (AUC=0.78), LDL-C:HDL-C i TG:HDL-C (AUC=0.77), chociaż różnice te nie były istotne statystycznie. Najwyższą wartość diagnostyczną zaobserwowano przy stężeniu CRP 0.85 mg/L.

Podsumowując, CRP jest lepszym predyktorem OZW i charakteryzuje się wyższą wartością diagnostyczną niż parametry profilu lipidowego, apolipoproteiny i wskaźniki aterogenności oraz może ułatwiać stratyfikację ryzyka u pacjentów z OZW.

4. CRP oraz inne markery zapalne w stratyfikacji ryzyka OZW.

Stan zapalny odgrywa kluczową rolę w inicjacji i progresji miażdżycy wyzwalając kaskadę zdarzeń prowadzących do niestabilności blaszki miażdżycowej, jej pęknięcia i w efekcie do całkowitej okluzji naczyń wieńcowych. **W pracy stanowiącej piąte osiągnięcie naukowe** dokonałam krytycznego przeglądu biomarkerów zapalnych o ugruntowanej przydatności klinicznej w stratyfikacji ryzyka chorób sercowo- naczyniowych (CRP, fibrynogen) oraz nowszych, potencjalnych markerów (fosfolipaza A2 związana z lipoproteinami [Lp-PLA2], mieloperoksydaza [MPO] i GDF-15). Praca stanowi podsumowanie wiedzy dotyczącej roli markerów zapalnych w chorobach sercowo- naczyniowych, łącząc aspekty patofizjologiczne i diagnostyczne z implikacjami klinicznymi oraz aktualnymi rekomendacjami. Chociaż wszystkie spośród omówionych w niniejszej pracy biomarkerów odgrywają istotną rolę prognostyczną u pacjentów z OZW, na szczególną uwagę zasługują: CRP, MPO oraz GDF-15.

4.1 Rola CRP w stratyfikacji ryzyka u pacjentów z OZW

U pacjentów z OZW CRP może być niezależnym czynnikiem ryzyka lub też czułym, ale nieswoistym markerem zapalenia i zakrzepicy. Ocena stężenia CRP u pacjentów z OZW ma znaczenie prognostyczne, niezależnie od innych, tradycyjnych czynników ryzyka. Podwyższone stężenie CRP u pacjentów z OZW przy przyjęciu do szpitala może dostarczyć informacji związanych z gorszym krótko- i długoterminowym rokowaniem. U chorych po zawale serca jest słabym czynnikiem rokowniczym nawrotu dławicy i ponownego zawału oraz wiąże się z niekorzystnym rokowaniem po przezskórnej angioplastyce wieńcowej i/lub pomostowaniu aortalno-wieńcowym. Co najważniejsze, włączenie CRP do oceny ryzyka względem skali GRACE dostarcza dodatkowych informacji, poprawia zdolność dyskryminacyjną, dopasowanie oraz kalibrację modelu stosowanego w prewencji wtórnej (poprawa statystyki-C z 0.795 do 0.823) oraz umożliwia reklasyfikację 12.2% pacjentów. Pomimo niezaprzeczalnej wartości prognostycznej u pacjentów z OZW, oznaczanie stężenia CRP nie jest przydatne przy podejmowaniu decyzji terapeutycznych oraz do oceny skuteczności leczenia w prewencji wtórnej.

4.2 Mieloperoksydaza jako wczesny marker zawału mięśnia sercowego

Mieloperoksydaza była szeroko badanym wczesnym biomarkerem u pacjentów z bólem wieńcowym i podejrzeniem OZW. Pomimo obiecujących wyników dotyczących

przydatności diagnostycznej MPO we wczesnej fazie OZW, wynikającej z przekonania, że uwalnianie MPO poprzedza proces uszkodzenia i martwicy kardiomiocytów, aktualnie rola tego biomarkera jest ograniczona. Przyczyniło się do tego nie tylko wprowadzenie wysokoczułych testów do oznaczania sercowej troponiny, lecz również brak dokładnie poznanego związku przyczynowo-skutkowego oraz rozbieżności metodyczne oznaczeń MPO.

4.3 GDF-15 jako nowy marker w stratyfikacji ryzyka u pacjentów z OZW

Przydatność kliniczna GDF-15 w stratyfikacji ryzyka pacjentów z OZW stała się przedmiotem badań przeprowadzonych w ostatnich latach. Dane epidemiologiczne wskazują, że GDF-15 jest biomarkerem pozwalającym przewidywać ryzyko zgonu i zdarzeń sercowo-naczyniowych nie tylko u pacjentów z OZW i niewydolnością serca, ale także u osób w wieku podeszłym. Według najnowszych badań oznaczenie GDF-15 dostarcza nowych informacji o wartości prognostycznej u pacjentów z OZW bez przetrwałego uniesienia odcinka ST w kombinacji ze skalą ryzyka GRACE oraz hs-cTnT. Co szczególnie interesujące, GDF-15 charakteryzował się wyższą wartością diagnostyczną niż pozostałe biomarkery, w tym CRP, kopeptyna, galektyna-3 czy sST2 i był najsilniej związany z ryzykiem zgonu i/lub ponownego zawału niezakończonego zgonem w obserwacji 6-miesięcznej. Dane te wyraźnie wskazują na dużą przydatność diagnostyczną oznaczania GDF-15, która może potencjalnie przyczynić się do zmiany strategii diagnostycznej u pacjentów z NSTEMI i UA.

Podsumowując osiągnięcie naukowe można sformułować następujące wnioski:

1. Test do oznaczania wysokoczułej troponiny I (Abbott Architect hs-cTnI) charakteryzuje się doskonałą precyzją, również w zakresie niskich stężeń oraz prawidłowo wyznaczonymi wartościami decyzyjnymi, co czyni go doskonałym narzędziem do zastosowania w diagnostyce i stratyfikacji ryzyka OZW.
2. Właściwy wybór i selekcja populacji referencyjnej ma krytyczny wpływ na wartość 99.percentyla górnego zakresu referencyjnego hs-cTnI. Czynnikiem determinującymi stężenie hs-cTnI w surowicy są: wiek, płeć męska, stężenie BNP oraz aterogenne parametry lipidowe, w szczególności apoB:apoAI i apoB.

3. U pacjentów z OZW białko C-reaktywne charakteryzuje się wyższą wartością diagnostyczną niż parametry profilu lipidowego, apolipoproteiny i wskaźniki aterogenności.
4. Pomimo mniejszej swoistości, markery zapalne nadal stanowią istotny element stratyfikacji ryzyka u pacjentów z OZW.

Piśmiennictwo cytowane w omówieniu publikacji wymienionych w pkt. 1-4:

1. Strimbu K, Tavel JA. What are Biomarkers? *Curr Opin HIV AIDS*. 2010; 5: 463–466
2. Biomarkers Definitions Working Group. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther*. 2001;69:89–95.
3. WHO International Programme on Chemical Safety Biomarkers in Risk Assessment: Validity and Validation. 2001. <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc222.htm>.
4. The Joint European Society of Cardiology/American College of Cardiology Committee. Myocardial infarction redefined- A consensus document of the Joint European Society of Cardiology/American College of Cardiology Committee for the Redefinition of Myocardial Infarction. *Eur Heart J*. 2000;21:1502–1513.
5. Thygesen K, Alpert JS, White HD. Joint ESC/ACCF/AHA/WHF Task Force for the Redefinition of Myocardial Infarction. Universal definition of myocardial infarction. *Eur Heart J*. 2007;28:2525–2538.
6. Thygesen K, Alpert JS, Jaffe AS i wsp. Third Universal Definition of Myocardial Infarction. *Eur Heart J*. 2012;33:2551–67.
7. Sitkiewicz D, Stępińska J, Solnica B i wsp. Markery biochemiczne w świetle uniwersalnej definicji zawału mięśnia sercowego. Rekomendacje Polskiego Towarzystwa Diagnostyki laboratoryjnej. *Diagn Lab*. 2012;3:353–358.
8. International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. Troponin Assay analytical characteristics 2014. http://www.ifcc.org/media/276661/IFCC%20Troponin%20Tables%20ng_L%20DRAFT%20Update%20NOVEMBER%202014.pdf (odwiedzane w maju 2017).
9. Collinson PO, Gaze D, Goodacre S. The clinical and diagnostic performance characteristics of the high sensitivity Abbott cardiac troponin I assay. *Clin Biochem*. 2015;48:275–81.
10. Abbott ARCHITECT STAT High Sensitive Troponin-I. Ulotka 2013. G1-0139/R02.

11. Giannitsis E, Kurz K, Hallermayer K, Jarausch J, Jaffe AS, Katus HA. Analytical validation of a high-sensitivity cardiac troponin T assay. *Clin Chem*. 2010;56:254–61.
12. Koerbin G, Abhayaratna WP, Potter JM, Apple FS, Jaffe AS, Ravalico TH i wsp. Effect of population selection on 99th percentile values for a high sensitivity cardiac troponin I and T assays. *Clin Biochem*. 2013;46:1636–43
13. Bais R. The effect of sample hemolysis on cardiac troponin I and T assays. *Clin Chem*. 2010;56:1357-9.
14. Clinical Laboratory Standards Institute. Evaluation of the Linearity of Quantitative Measurement Procedures: a Statistical Approach; Approved Guidelines, EP6-A. Wayne, PA. Clinical and Laboratory Standards. 2003.
15. Jardine RM. Consensus statement on the use of high sensitivity cardiac troponins. *SA Heart Journal North America* 2013;9:1–8.
16. Lippi G, Avanzini P, Musa R, Aloe R, Cervellin G. Carryover does not affect results of Beckman Coulter highly-sensitive-AccuTnI assay on Access 2. *Clin Chem Lab Med*. 2013;51:141-143.
17. Apple FS, Collinson PO. Analytical characteristics of high-sensitivity cardiac troponin assays. *Clin Chem*. 2012;58:54–61.
18. Sandoval Y, Apple FS. The global need to define normality: the 99th percentile value of cardiac troponin. *Clin Chem*. 2014;60:455–462.
19. Collinson PO, Heung YM, Gaze D i wsp. Influence of population selection on the 99th percentile reference value for cardiac troponin assays. *Clin Chem*. 2012;58:219–225.
20. Keller T, Ojeda F, Zeller T i wsp. Defining a reference population to determine the 99th percentile of a contemporary sensitive cardiac troponin I assay. *Int. J Cardiol*. 2013;167:1423–1429.
21. Cardinaels EP, Mingels AM, Jacobs LH i wsp. A comprehensive review of upper reference limits reported for (high-)sensitivity cardiac troponin assays: the challenges that lie ahead. *Clin Chem Lab Med*. 2012;50:791–806.
22. McMurray JJ, Adamopoulos S, Anker SD i wsp. ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2012. *Eur J Heart Fail*. 2012;14:803–869.
23. The International Expert Committee. International Expert Committee report on the role of the A1C assay in the diagnosis of diabetes, *Diabetes Care*. 2009;32:1327–1334.
24. Stevens PE, Levin A. A Kidney Disease: Improving Global Outcomes Chronic Kidney Disease Guideline Development Work Group Members, Evaluation and management

- of chronic kidney disease: synopsis of the kidney disease: improving global outcomes 2012 clinical practice guideline. *Ann Intern Med.* 2013;158:825–830.
25. Aw TC, Phua SK, Tan SP. Measurement of cardiac troponin I in serum with a new high-sensitivity assay in a large multi-ethnic Asian cohort and the impact of gender. *Clin Chim Acta* 2013;422:26–28.
 26. Gore MO, Seliger SL, deFilippi CR i wsp. Age- and sex-dependent upper reference limits for the high-sensitivity cardiac troponin T assay. *J Am Coll Cardiol.* 2014;63:1441–1448.
 27. Yusuf S, Hawken S, Ounpuu S i wsp. Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case control study. *Lancet* 2004;364:937–952.
 28. McQueen MJ, Hawken S, Wang X i wsp. Lipids, lipoproteins, and apolipoproteins as risk markers of myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): a case control study. *Lancet* 2008;372:224–233.
 29. Walldius G, Jungner I, Holme I, Aastveit AH, Kolar W, Steiner E. High apolipoprotein B, low apolipoprotein A-I, and improvement in the prediction of fatal myocardial infarction (AMORIS study): a prospective study. *Lancet* 2001;358:2026–2033.
 30. Di Angelantonio E, Gao P, Pennells L i wsp. Lipid-related markers and cardiovascular disease prediction. *JAMA* 2012;307:2499–2506.
 31. Segre CA, Hueb W, Garcia RM i wsp. Troponin in diabetic patients with and without chronic coronary artery disease. *BMC Cardiovasc Disord.* 2015;15:72.
 32. Biasucci LM, Koenig W, Mair J i wsp. How to use C-reactive protein in acute coronary care. *Eur Heart J.* 2013;34:3687–3690.
 33. de Beer FC, Hind CRX, Fox KM, Allan RM, Maseri A, Pepys MB. Measurement of serum C-reactive protein in myocardial ischemia and infarction. *Br Heart J.* 1982;47:239–243.
 34. Lloyd-Johns DM, Liu K, Tian L i wsp. Narrative review: assessment of C-reactive protein in risk prediction for cardiovascular disease. *Ann Intern Med.* 2006;145:35–42.

Cykl publikacji stanowiący szczególne osiągnięcie naukowe przyczynił się do poszerzenia wiedzy na temat biomarkerów w diagnostyce i stratyfikacji ryzyka OZW w ich kontekście

analitycznym i klinicznym, ze szczególnym uwzględnieniem troponiny sercowej oraz markerów zapalnych.

5. Charakterystyka pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

5.1 Podsumowanie współczynnika oddziaływania (IF), punktów Polskiego Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego (Pol. MNiSW) innych publikacji niż osiągnięcie osiągnięć naukowych

Po wykluczeniu publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego, IF dla pozostałych publikacji wynosi 30,6 w tym IF = 8,59 dla artykułów, w których jestem pierwszym autorem. Suma wszystkich punktów MNiSW, po wykluczeniu publikacji zawierających osiągnięcie naukowe, wynosi 479, w tym 107 punktów MNiSW dla artykułów, w których jestem pierwszym autorem.

Moje publikacje były cytowane 148 razy według Web of Science (indeks H: 8) i 239 według Google Scholar (indeks H: 8).

5.2 Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

W latach 2004-2008 przeprowadzałam badania dotyczące występowania podwyższonego stężenia CRP u klinicznie zdrowych osób z normolipidemią, które były tematem mojej rozprawy doktorskiej wykonywanej pod opieką Pani Prof. dr hab. Grażyny Odrowąż-Sypniewskiej. Wyniki powyższej pracy wykazały, że u klinicznie zdrowych kobiet i mężczyzn w wieku 25-40 lat z normolipidemią, co trzecia osoba posiadała podwyższone stężenie CRP ($> 1\text{mg/l}$), a co siódma stężenie CRP wskazujące na wysokie ryzyko wystąpienia chorób sercowo-naczyniowych. Kobiety stosujące antykoncepcję hormonalną charakteryzowały się ponad trzykrotnie wyższą medianą stężeń CRP niż pozostałe i mężczyźni w tym samym wieku. Wśród osób z normolipidemią odsetek badanych z wartościami LDL-cholesterolu i triglicerydów w najwyższym tercylu oraz wartościami HDL-cholesterolu w najniższym tercylu był największy gdy stężenie CRP przekraczało 3mg/l .

Wyniki tej pracy opublikowałam w czasopiśmie z listy filadelfijskiej (załącznik 8, punkt I, pozycja I.-8) oraz w czasopiśmie polskim (załącznik 8, punkt I, pozycja I.-1).

Aktualnie moje zainteresowania naukowe stanowią kontynuację tematyki związanej z osiągnięciem naukowym i dotyczą szeroko pojętej roli hs-cTnI w diagnostyce OZW w

aspekcie analitycznym i klinicznym. Podsumowaniem mojej działalności naukowej dotyczącej tego zagadnienia są prace poglądowe opublikowane w czasopiśmie polskim i zagranicznym (załącznik 8, punkt III, pozycja III.-7, III.-8, III.-9).

Poza tematyką rozprawy doktorskiej oraz cyklu publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe będących podstawą o ubieganie się o tytuł doktora habilitowanego moja działalność naukowo- badawcza obejmowała zagadnienia dotyczące:

1. Wyznaczenia wartości 99.percentyla dla hs-cTnI w zdrowej polskiej populacji referencyjnej oraz identyfikacji czynników determinujących wartość tego punktu odcięcia oraz stężenie hs-cTnI w surowicy. Wyniki dotyczące tego zagadnienia zostały opublikowane w czasopiśmie polskim (załącznik nr 8, punkt I, pozycja I.-18).
2. Wczesnej diagnostyki laboratoryjnej w OZW oraz zaburzeń lipidowych u pacjentów z OZW w tym:
 - oceny wartości diagnostycznej białka wiążącego kwasy tłuszczowe typu sercowego (H-FABP) w diagnostyce OZW. Wyniki powyższych badań opublikowane zostały w czasopiśmie polskim (załącznik 8, punkt I, pozycja I.2)
 - zastosowania strategii wielomarkerowej przy użyciu technologii bioczipów we wczesnej diagnostyce OZW. Wyniki tych badań opublikowane zostały w czasopismach anglojęzycznych (załącznik 8, punkt I, pozycja I.3 i I.-5).
 - efektywności diagnostycznej mieloperoksydazy w rozpoznaniu OZW. Wyniki opublikowane zostały w czasopiśmie anglojęzycznym (załącznik 8, punkt I, pozycja I.-9).
 - porównania stężeń apolipoprotein i wartości wskaźnika aterogenności apoB:apoAI z parametrami profilu lipidowego u kobiet z OZW (załącznik 8, punkt I, pozycja I.-6).
 - oceny wydajności diagnostycznej wskaźnika TG:HDL-C w ostrych zespołach wieńcowych przy zastosowaniu analizy drzew decyzyjnych (załącznik 8, punkt I, pozycja I.-25).
3. Wyznaczenia wartości referencyjnych galektyny-3 w zdrowej populacji referencyjnej, oraz zidentyfikowania czynników biologicznych determinujących stężenie tego biomarkera (załącznik 8, punkt I, pozycja I.-28).

4. Występowania zaburzeń lipidowych i metabolicznych u zdrowych osób oraz osób z nadwagą lub otyłością, a w szczególności:
 - przydatności diagnostycznej nie-HDL-cholesterolu jako czynnika prognostycznego w chorobach sercowo-naczyniowych. Wyniki tych badań opublikowane zostały w czasopiśmie anglojęzycznym (załącznik 8, punkt I, pozycja I.-7).
 - związku pomiędzy stężeniem białka wiążącego kwasu tłuszczowego typu A (A-FABP) z aterogennymi czynnikami ryzyka i insulinoopornością u młodych kobiet z nadwagą i otyłością (załącznik 8, punkt I, pozycja I.-13).
 - związku pomiędzy stężeniem gamma-glutamylotranspeptydazy (GGTP) z aterogennymi czynnikami ryzyka i insulinoopornością u młodych kobiet z nadwagą i otyłością (załącznik 8, punkt I, pozycja I.-30).
5. Oceny stężenia wybranych biomarkerów: 25(OH)D₃, hormonu anty-mullerowskiego (AMH) oraz inhibin A i B u pacjentek z rakiem jajnika oraz ich związku z 5-letnim przeżyciem (załącznik 8, punkt I, pozycja I.-11, I.-14, I.-17)
6. Związku pomiędzy stężeniem 25(OH)D a markerami zapalnymi i markerami przebudowy dróg oddechowych u dzieci z nowo zdiagnozowaną nieleczoną astmą (załącznik 8, punkt I, pozycja I.-24 i I.-29).

Byłam również zaangażowana w inne tematy badawcze prowadzone w Katedrze i Zakładzie Diagnostyki Laboratoryjnej wpływu wybranych przeciwciał i białka C-reaktywnego u chorych na reumatoidalne zapalenie stawów w zależności od zaawansowania choroby (załącznik 8, punkt I, pozycja I.-4).

Współpracowałam również jako jeden z wykonawców w programach badawczych prowadzonych we współpracy z innymi jednostkami Collegium Medicum UMK w Bydgoszczy tj: Katedrą i Kliniką Kardiologii i Chorób Wewnętrznych, Katedrą Nefrologii, Nadciśnienia Tętniczego i Chorób Wewnętrznych (1a – 7a), Katedrą Ginekologii i Położnictwa, Katedrą Endokrynologii i Katedrą Psychatrii.

W ramach działalności naukowej w Katedrze i Zakładzie Diagnostyki Laboratoryjnej wykonuję dodatkowo oznaczenia biochemiczne na analizatorze Horiba ABX Pentra 400 oraz

badania z zastosowaniem technologii bioczipów na analizatorze Randox Evidence Investigator.

Pozostałe informacje dotyczące osiągnięć dydaktycznych oraz organizacyjnych wyszczególniłam w załączniku 4 do wniosku o przeprowadzenie postępowania habilitacyjnego.

Podpis wnioskodawcy

Magdalena Kintus