

Poznań, 6 lutego 2023 roku

Dr hab. n. med. Ewa Wysocka
Katedra i Zakład Diagnostyki Laboratoryjnej
Wydział Medyczny
Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego
w Poznaniu

Recenzja rozprawy doktorskiej
w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu, w dyscyplinie nauki medyczne
przygotowanej przez
mgr Agnieszkę Muchę

**pt. Ocena stężenia izoform transferyny we krwi chorych
na pierwotne zapalenie dróg żółciowych oraz zapalenia trzustki.**

Promotor: Prof. dr hab. Lech Chrostek
Zakład Diagnostyki Biochemicznej
Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej
Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

Zgodnie z Uchwałą Senatu Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku z dnia 24.11.2022 r. wskazaną w piśmie Prodziekana Wydziału Lekarskiego z Oddziałem Stomatologii i Oddziałem Nauczania w Języku Angielskim UMB z dnia 25.11.2022 r., przedstawiono do oceny rozprawę doktorską mgr Agnieszki Muchy, w oparciu o cykl dwóch publikacji naukowych - w każdej Doktorantka jest pierwszym Autorem:

Publikacja nr 1. Praca oryginalna: Grytczuk A. (obecnie Mucha A.), Bauer A., Gruszewska E., Cylwik B., Chrostek L. *Changed Profile of Serum Transferrin Isoforms in Primary Biliary Cholangitis*. Journal of Clinical Medicine. 2020, 9(9), 2894. IF 4,242 i MNiSW 140.000.

Publikacja nr 2. Praca oryginalna: Mucha A., Żaczek M., Kralisz M., Gruszewska E., Cylwik B., Panasiuk A., Chrostek L. *The Serum Profile of Transferrin Isoforms in Pancreatitis*. Journal of Clinical Medicine. 2022, 11(6), 1638. IF 4,964 i MNiSW 140.000.

Pozostały dorobek publikacyjny Doktorantki, nie włączony do rozprawy doktorskiej, obejmuje dwie prace o sumarycznym współczynniku oddziaływania IF=9,0081 i punktacji MNiSW=240.000 oraz trzy streszczenia zjazdowe: dwa polskie i jedno zagraniczne.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska liczy w sumie 66 stron i składa się z kilkunastu części: Spis treści, Wykaz dorobku naukowego z wyodrębnieniem publikacji stanowiących rozprawę doktorską, innych publikacji oraz streszczeń zjazdowych, Wykaz skrótów, Wstęp, Cel pracy, Materiał i metody, Wyniki – wskazanie wyników Publikacji nr 1 i Publikacji nr 2, Dyskusja, Wnioski, Piśmiennictwo, Streszczenia: w języku polskim i w języku angielskim, Publikacje stanowiące rozprawę doktorską (dwa artykuły), Zgoda Komisji Bioetycznej, Oświadczenie autora rozprawy doktorskiej,

Oświadczenia współautorów publikacji, Informacja o charakterze udziału współautorów w publikacjach wraz z szacunkowym określeniem procentowego wkładu.

Autorka określiła swój udział w przygotowanie publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej. Do każdej z dwóch publikacji Doktorantka wniosła 55-procentowy wkład. W każdej pracy oryginalnej Jej udział polegał na opracowaniu koncepcji pracy, zebraniu i przeglądzie literatury, oznaczeniu badanych parametrów, interpretacji uzyskanych wyników, sformułowaniu wniosków, napisaniu i przygotowaniu pracy do publikacji. Każdy Współautor dwóch przedmiotowych prac określił swój udział w przygotowaniu publikacji i wyraził zgodę na wykorzystanie publikacji w pracy doktorskiej mgr Agnieszki Muchy.

Rozprawa doktorska dotyczy znaczenia klinicznego profilu izoform transferyny w surowicy chorych na pierwotne zapalenie dróg żółciowych oraz ostre i przewlekłe zapalenie trzustki. Choroby te, w odpowiednich okresach swojego rozwoju mogą przebiegać z podobnym lub nakładającym się spektrum objawów klinicznych. Diagnostyka różnicowa jest wówczas prowadzona w oparciu o zdobycze diagnostyki obrazowej i laboratoryjnej. Trudności potęgują niespecyficzne objawy kliniczne okresu początkowego tych stanów patologicznych, jak również konieczność uwzględniania innych źródeł procesu zapalnego u chorego. Wyzwaniem pozostaje także rokowanie. Diagnostyka laboratoryjna odzwierciedla osiągnięcia z dziedziny biochemii w praktyce klinicznej oraz dysponuje możliwościami standaryzacji procesu analitycznego i określania znaczenia diagnostycznego wyników badań laboratoryjnych, dlatego z uwagą śledzimy wszystkie publikacje z tego obszaru.

Wykaz skrótów nie obejmuje wszystkich skrótów zastosowanych w rozprawie doktorskiej, niektóre skróty nie zostały wyjaśnione przy pierwszym ich użyciu lub nie zostały wyjaśnione w ogóle.

We Wstępie Kandydatka zwięźle scharakteryzowała pierwotne zapalenie dróg żółciowych oraz ostre i przewlekłe zapalenie trzustki, wraz z obowiązującymi zasadami diagnostyki tych chorób. Doktorantka przedstawiła proces glikozylacji i wskazała przykład transferyny - odwołując się do podstawowego piśmiennictwa z tego tematu oraz wymieniła izoformy transferyny, kierując czytelnika do pozycji literaturowych ostatnich trzech lat, w celu poszerzenia wiedzy na temat znaczenia klinicznego profilu izoform tego białka. Uzupełnienie tej części rozprawy doktorskiej może stanowić część Dyskusji oraz fragmenty Publikacji nr 1 (*Introduction*). Doktorantka oszczędnie potraktowała tę część rozprawy doktorskiej.

Kandydatka syntetycznie przedstawiła założenia i cele pracy. Główny cel tj. oznaczenie stężeń izoform transferyny w surowicy krwi w pierwotnym zapaleniu dróg żółciowych oraz ostrym i przewlekłym zapaleniu trzustki, stanowił podstawę do realizacji pięciu celów szczegółowych:

Celem 1 było porównanie stężenia całkowitego transferyny oraz jej izoform w surowicy pomiędzy grupą osób z PBC (tj. pierwotnym zapaleniem dróg żółciowych), z cholestazą zewnątrzwątrobową oraz grupą kontrolną - jego realizację stanowi Publikacja nr 1. Cel 2 obejmował ocenę stężenia izoform transferyny w surowicy krwi pacjentów z PBC w zależności od stopnia

histologicznego zaawansowania choroby w skali Ludwiga – cel ten realizuje Publikacja nr 1. Celem 3 było porównanie stężenia całkowitego transferyny i jej izoform w surowicy pomiędzy grupą pacjentów z OZT (tj. ostrym zapaleniem trzustki), PZT (tj. przewlekłym zapaleniem trzustki) i grupą kontrolną – jego realizację stanowi Publikacja nr 2. Cel 4 dotyczył porównania stężenia izoform transferyny w surowicy krwi w zależności od postaci morfologicznej i etiologii OZT – jego realizację przedstawia Publikacja nr 2.

Cel 5 obejmował porównanie profilu izoform transferyny w zapaleniach trzustki z profilami w innych chorobach, na podstawie literatury: nowotworach trzustki, przewlekłych zapaleniach wątroby oraz chorobach reumatycznych. Realizację tego celu Doktorantka zawarła w kilku zdaniach podsumowujących. Szkoda, że nie przedstawiła porównania z użyciem istotnych/kluczowych wykresów lub tabel z wynikami, pochodzących z opublikowanych prac, na które powołuje się w rozprawie doktorskiej oraz w Publikacji nr 2.

Metodologia zastosowana w pracy doktorskiej jest poprawna. Została przedstawiona w Rozprawie doktorskiej i zawarta w pracach oryginalnych. W Publikacji 1 badaniami objęto 160 osób: 76 pacjentów z pierwotnym zapaleniem dróg żółciowych, 44 chorych z cholestazą zewnątrzwątrobową w przebiegu raka brodawki Vatera i 40 osób zdrowych. W Publikacji 2 przedstawiono wyniki 156 badanych osób: 84 pacjentów z ostrym zapaleniem trzustki, 42 pacjentów z przewlekłym zapaleniem trzustki oraz 30 osób zdrowych. W rozprawie doktorskiej, w tym w Publikacji 1, podczas interpretacji wyników oceny stężenia transferyny i profilu jej izoform u pacjentów z cholestazą zewnątrzwątrobową, należałoby częściej zaznaczać obecność choroby podstawowej – nowotworowej (transferyna jako ujemne białko ostrej fazy), zwłaszcza, że stopień zaawansowania klinicznego choroby nie został przedstawiony. W tym miejscu zachęcam Doktorantkę do kontynuacji badań naukowych – np. przeprowadzenia analizy stężenia transferyny i profilu jej izoform u pacjentów z nienowotworową cholestazą zewnątrzwątrobową oraz pacjentów chorujących na raka dróg żółciowych.

W rozdziale 5.4. *Metody* Kandydatka mogła przedstawić sposób oceny stężenia izoform transferyny (Tf) wraz z dokładnym wyjaśnieniem terminu „stężenie izoform(y) transferyny”. Doktorantka używa w rozprawie doktorskiej zamiennie określeń „profil izoform transferyny” i „stężenie izoform transferyny”, co sprowokowało kilka uwag:

We Wstępie czytamy o dziewięciu izoformach transferyny (od asjalo-Tf do oktasjalo-Tf). W Metodach wskazano użycie techniki elektroforezy kapilarnej dla przeprowadzenia rozdziału pięciu izoform transferyny (asjalo-, disjalo-, trisjalo-, tetrasjalo- i pentasjalo-Tf) i uzyskania stężenia tych izoform oraz metody immunoturbidymetrycznej w celu pomiaru stężenia całkowitego transferyny w surowicy. W Publikacjach nr 1 i nr 2 wyniki oceny izoform transferyny zostały przedstawione w procentach. W rozdziałach 6. *Wyniki* i 7. *Dyskusja*, znajdujemy określenia: „stężenia disjalotransferyny ...były istotnie niższe” oraz „nie uzyskałam zmiany stężeń izoform transferyny w zależności od zaawansowania histologicznego według skali Ludwiga” (na przykładzie Publikacji nr 1). Badacze inspirujący się ocenianą rozprawą doktorską doceniliby wyjaśnienie stosowanych pojęć i terminów

oraz biochemicznych i matematycznych podstaw wyrażenia wyniku pomiaru izoform transferyny. Ułatwiłoby to rozeznanie uzyskanych przez Kandydatkę wyników badań i ustosunkowanie się do przeprowadzonej dyskusji. W tym miejscu proszę Doktorantkę o stosowne wyjaśnienie.

Przedstawienie metod statystycznych wraz ze sposobem wyrażenia wyników badań mogłoby być dokładniejsze. Z pewnością, to na podstawie analizy rozkładu badanych cech wybrano testy nieparametryczne, wobec czego średnia i odchylenie standardowe z reguły nie są podstawą przedstawiania wyników badań.

Rozdział 6. *Wyniki* stanowi uporządkowane przedstawienie rezultatów badań opublikowanych w Publikacjach nr 1 i nr 2. Analizując opublikowane wyniki, w nawiązaniu do uwag dotyczących rozdziału Metody (patrz wyżej), np. w Publikacji nr 2: Fig.1 (str. 51 rozprawy doktorskiej), rozważając procentowy udział tetrasjalotransferyny w odniesieniu do stężenia całkowitego transferyny w surowicy pacjenta z ostrym zapaleniem trzustki (AP), nie można jednoznacznie przyjąć wersji Autorów o zwiększonym stężeniu tej izoformy w surowicy pacjentów z AP w porównaniu z grupą kontrolną. Podobnie w przypadku pentasjalotransferyny w przewlekłym zapaleniu trzustki. Nie zmienia to faktu wykazania odmiennego profilu izoform transferyny w surowicy pacjentów z ww. chorobami. Termin „profil izoform transferyny” jest często używany w obu Publikacjach i w opinii recenzenta nie powinien być stosowany zamiennie ze „stężeniem izoform(y) transferyny”, zwłaszcza, że w Publikacji nr 2 (*Discussion*) zamieszczono podstawowe zasady interpretacji wyniku oceny izoform transferyny. Szkoda, że Autorzy nie skorzystali z własnego przykładu dla ujednolicenia terminów w całej publikacji. Odważne określenie „stężenie izoform” dla oceny profilu izoform transferyny (procentowego udziału każdej z pięciu glikoform), znalazło uznanie u recenzentów Publikacji nr 1 i nr 2, mimo tego, w perspektywie aplikacji do praktyki klinicznej należy zachować „biochemiczny realizm”.

Dyskusja stanowi omówienie i laboratoryjno-kliniczne podsumowanie uzyskanych wyników oraz ich odniesienie do rutynowych analiz laboratoryjnych przeprowadzanych we krwi chorych z pierwotnym zapaleniem dróg żółciowych i zapaleniami trzustki. Kandydatka zestawia efekty badań opublikowanych w Publikacjach nr 1 i nr 2 z oceną profilu izoform transferyny przedstawioną przez badaczy w przewlekłych zapaleniach wątroby, raku trzustki i chorobach reumatycznych. Uzyskane przez Doktorantkę wyniki stanowią cenne uzupełnienie zestawu możliwych zmian profilu izoform transferyny u ludzi w różnych stanach chorobowych. Jest to niezbędne dla przyszłego ustalenia znaczenia diagnostycznego tego parametru. Możliwy brak zależności profilu izoform transferyny od stopnia zaawansowania PBC (w klasyfikacji Ludwiga), może stanowić wstęp do badań nad wartością diagnostyczną tego parametru w ewentualnej ocenie ryzyka raka dróg żółciowych. Podobnie, potwierdzony w kolejnych badaniach naukowych brak różnic w profilu izoform transferyny dla różnych postaci morfologicznych i etiologicznych ostrego zapalenia trzustki (a w ewentualnej konsekwencji - przewlekłego zapalenia trzustki, PZT), stwarza szansę analizy profilu izoform transferyny w ocenie progresji PZT do raka trzustki.

Kandydatka zrealizowała cele rozprawy doktorskiej i przedyskutowała jej wyniki. Pięć wniosków rozprawy doktorskiej, poprawnie sformułowanych, odpowiada postawionym celom. Wnioski nr 1 i nr 2 zachęcają do dalszych badań nad kliniczną użytecznością zmian profilu izoform transferyny we krwi pacjentów z pierwotnym zapaleniem dróg żółciowych. Wniosek nr 4 może stanowić impuls do analizy profilu izoform transferyny w badaniach prospektywnych, ze szczególnym uwzględnieniem oceny ryzyka raka trzustki. Z uwagi na oszczędne przedstawienie realizacji Celu nr 5, co wskazano wcześniej, proszę o przedstawienie wyników porównania profilu izoform transferyny w zapaleniach trzustki z profilami w innych chorobach (na podstawie literatury) i szersze wyjaśnienie Wniosku nr 5.

Doktorantka zebrała 54 pozycje piśmiennictwa, które zawierają istotne dla rozprawy doktorskiej publikacje i w około 13% pochodzą lat 2020-2022, w około 44% z lat 2015-2019, w około 17% z lat 2005-2014 i w 26% sprzed 2000 roku.

Podsumowując, przedłożona do recenzji rozprawa doktorska na podstawie dwóch publikacji oryginalnych, wzbogaca temat poszukiwań biomarkerów w diagnostyce różnicowej stanów zapalnych dróg żółciowych i trzustki u osób dorosłych. Kandydatka przeprowadziła odpowiednie analizy laboratoryjne i statystyczne oraz interpretację uzyskanych wyników. Doktorantka zrealizowała założone cele. Wyniki rozprawy doktorskiej mgr Agnieszki Muchy są ważnym głosem w dyskusji kliniczno-laboratoryjnej, wskazującym potencjalne znaczenie parametrów krwi, w tym izoform transferyny, w badaniach naukowych i praktyce klinicznej. Sformułowane przez Kandydatkę wnioski stanowią ważne przesłanie medycyny laboratoryjnej dla diagnostyki różnicowej stanów zapalnych dróg żółciowych i trzustki. Nowością rozprawy doktorskiej jest wykazanie odmiennego profilu izoform transferyny u pacjentów z pierwotnym zapaleniem dróg żółciowych, niezależnie od stopnia zaawansowania choroby, w porównaniu do grupy kontrolnej oraz pacjentów z cholestazą wewnątrzwątrobową w przebiegu raka brodawki Vatera, a także analiza profilu izoform transferyny u pacjentów z ostrym i przewlekłym zapaleniem trzustki w odniesieniu do innych stanów zapalnych z udokumentowanymi zmianami profilu izoform transferyny we krwi. Uwagi recenzenta nie umniejszają wartości rozprawy doktorskiej, są formą niezbędnej dyskusji naukowej poprzedzającej ewentualną karierę parametrów biochemicznych w diagnostyce laboratoryjnej.

Biorąc pod uwagę całość rozprawy doktorskiej mgr Agnieszki Muchy, stwierdzam, że rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. *Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce* (Dz. U. z 2022 r. poz. 574 z późn. Zm.). Wnoszę do Wysokiego Senatu Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku, o dopuszczenie mgr Agnieszki Muchy do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Kierownik
Katedry i Zakładu Diagnostyki Laboratoryjnej
Ewa Wysocka
dr hab. n. med. Ewa Wysocka