



UNIwersytet Medyczny IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH WE WROCLAWIU

Wydział Farmaceutyczny

Katedra Analityki Medycznej

dr hab. Iwona Bil-Lula, prof. UMW

Wrocław, 17.01.2023

Recenzja rozprawy doktorskiej Pani Agnieszki Muchy pt.: „Ocena stężenia izoform transferyny we krwi chorych na pierwotne zapalenie dróg żółciowych oraz zapalenia trzustki”, napisanej pod kierunkiem promotora- prof. dr hab. Lecha Chrostka i wykonanej w Zakładzie Diagnostyki Biochemicznej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku

Diagnostyka pierwotnego zapalenia dróg żółciowych jest skomplikowana i wymaga zastosowania metod diagnostyki różnicowej m.in. z pierwotnym stwardniającym zapaleniem dróg żółciowych oraz żółtaczką mechaniczną. Diagnostyka biochemiczna polega m.in. na oznaczeniu aktywności ALP, GGT, AST, ALT, stężenia bilirubiny, ocenie obecności i miana autoanticypiał AMA, ANA. Dodatkowo, w przypadkach nierozstrzygających, włączana jest analiza wycinka biopsyjnego celem oceny występowania zmian zapalnych i destrukcyjnych w przewodach żółciowych. W diagnostyce różnicowej stosuje się także badanie USG, cholangiopankreatografię rezonans magnetyczny oraz ultrasonografię endoskopową, a w ocenie stopnia zwłóknienia niezastąpiona okazuje się elastografia. Należy jednak pamiętać, iż pomimo przyjętego powszechnie algorytmu diagnostycznego PBC, biopsja wątroby pozostaje badaniem inwazyjnym i niesie za sobą ryzyko poważnych powikłań.

Podobnie, diagnostyka ostrego i przewlekłego zapalenia trzustki, oprócz parametrów biochemicznych włączających ocenę m.in: aktywności amylazy i lipazy, ALT, AST, ALP, GGT, LDH i stężenia bilirubiny w surowicy, amylazy w moczu, wskaźników stanu zapalnego włącza badania obrazowe jak USG, TK oraz inwazyjne jak ECPW i EUS, w przypadkach niejednoznacznych.

Od kilkadziesiąt lat, na całym świecie, prowadzi się badania nad możliwością wykorzystania profili izoform glikoprotein surowicy krwi jako nieinwazyjnych markerów diagnostycznych, zarówno do rozpoznawania zaburzeń, diagnostyki różnicowej czy oceny intensywności procesu chorobowego. Istnieją liczne doniesienia na temat glikozylacji białek w stanach zapalnych, w chorobach wątroby, chorobach reumatycznych czy procesach

nowotworowych różnych narządów, co potwierdza powyższą hipotezę. Dane literaturowe na temat możliwości wykorzystania oznaczeń izoform transferyny w diagnostyce i monitorowaniu pierwotnego zapalenia dróg żółciowych oraz w ostrym i przewlekłym zapaleniu trzustki są nadal kontrowersyjne i wymagają dalszych badań. Z uwagi na powyższe, cel i założenia, przedłożonej do recenzji rozprawy doktorskiej, wydają się być istotne klinicznie i wpisują się w ogólnoswiatowe trendy naukowe i diagnostyczne.

Przedstawiona do oceny dysertacja jest opracowaniem na podstawie cyklu 2 publikacji oryginalnych. W mojej ocenie, układ pracy jest przejrzysty i zgodny z wymaganiami stawianymi rozprawom doktorskim.

Dysertację rozpoczyna spis treści, wykaz całkowitego dorobku naukowego Doktorantki, z podziałem na publikacje stanowiące podstawę rozprawy doktorskiej, publikacje nie włączone do dysertacji, streszczenia zjazdowe oraz wykaz skrótów. Właściwą treść rozprawy rozpoczyna zwięzły wstęp teoretyczny, w którym, w sposób syntetyczny i kompleksowy, omówiono zagadnienia związane z tematem rozprawy doktorskiej. Doktorantka przybliżyła obecny stan wiedzy na temat pierwotnego zapalenia dróg żółciowych, ostrego i przewlekłego zapalenia trzustki, ich charakterystykę kliniczną i algorytmy diagnostyczne. Ponadto, we wstępie poświęcono kilka podrozdziałów na zapoznanie czytelnika z procesem glikozylacji białek, ze szczególnym uwzględnieniem izoform transferyny. Informacje zawarte we wstępie stanowią wyczerpujące wprowadzenie, niezbędne do zrozumienia hipotezy i zasadności prowadzonych badań.

Głównym założeniem i celem rozprawy doktorskiej Pani Agnieszki Muchy była ocena stężeń izoform transferyny w surowicy krwi pacjentów z pierwotnym zapaleniem dróg żółciowych oraz z ostrym i przewlekłym zapaleniem trzustki. Cele szczegółowe rozprawy obejmowały: porównanie całkowitego stężenia transferyny oraz jej izoform w surowicach osób z PBC, cholestazą wątrobową, OZT, PZT, grupą kontrolną, ocenę korelacji stężeń izoform transferyny ze stopniem histologicznego zaawansowania PBC w skali Ludwiga, z postacią morfologiczną i etiologią OZT oraz porównanie profili izoform w zapaleniach trzustki z profilami w innych chorobach, włączając chorobę nowotworową, stany zapalne i choroby reumatyczne. Według mojej oceny cele pracy zostały sformułowane poprawnie i opisane zrozumiale, a sam pomysł Autorki, dotyczący analizy potencjalnych, nieinwazyjnych markerów diagnostycznych PBC, OZT i PZT uważam za bardzo interesujący i istotny w praktyce klinicznej.

W rozdziale „Materiał i metody” Doktorantka przedstawia materiał do badań, grupy badane, metody diagnostyczne oraz statystyczne. Autorka przeprowadziła badanie w grupie 76 pacjentów z pierwotnym zapaleniem dróg żółciowych, 44 pacjentów z rakiem brodawki Vatera,

którzy służyli jako model cholestazy zewnątrzwątrobowej, 84 pacjentów z OZT, 42 chorych z PZT oraz, zależnie od badania, 40 lub 30 osób zdrowych. Dodatkowo, odpowiednich pacjentów podzielono na grupy, m.in. w oparciu o stadium PBC oraz postacię OZT.

W podrozdziale „Wyniki” Doktorantka przedstawiła opis wyników opublikowanych w dwóch artykułach oryginalnych. Na uznanie zasługuje publikacja prac w renomowanym czasopiśmie o nazwie Journal of Clinical Medicine, cechującym się zasięgiem międzynarodowym oraz dużym współczynnikiem wpływu. Co ciekawe, Autorka wykazała istotnie wyższe stężenia całkowitej transferyny u osób z PBC i jednocześnie obniżone stężenia nisko usjalowanych form transferyny (di- oraz trisjalotransferyny) u pacjentów z PBC, w porównaniu do zdrowej kontroli. Podwyższone stężenie całkowitej transferyny, wg słusznej opinii Autorki, może wynikać z uszkodzenia błon organelli oraz błon komórkowych hepatocytów, co może stanowić źródło wzmożonego uwalniania transferyny do przestrzeni pozakomórkowej. Odmiennie, w cholestazie pozawątrobowej w porównaniu do PBC zmiany wykazywały z kolei stężenia di-, tetra- i pentasjalotransferyny. Zarówno stężenia poszczególnych izoform, jak i stężenie całkowite transferyny nie korelowały natomiast z histologicznymi stopniami zaawansowania PBC. Dodatkowo, przeprowadzono analizę innych, znanych parametrów biochemicznych jak: kwas żółciowy, ALP, GGT, jednakże nie wykazano ich korelacji z izoformami transferyny.

Bardzo interesującym wynikiem było wykazanie istotnie wyższych stężeń wysoko usjalowanych form transferyny (penta- oraz tetrasjalotransferyny), odpowiednio u osób z OZT/PZT lub OZT w porównaniu do zdrowej kontroli. Odmiennie niż w PBC, nie wykazano zmian stężeń izoform niskosjalowanych w OZT, PZT oraz w grupie kontrolnej, natomiast wykazano istotnie niższe stężenie całkowitej transferyny (jako ujemnego białka ostrej fazy) w zapaleniach trzustki, jak również w OZT w porównaniu do PZT. Uzyskane wyniki badań wykluczyły możliwość zastosowania izoform transferyny jako markerów różnicujących ostre i przewlekłe zapalenie trzustki

W podrozdziale „Dyskusja” Pani Mucha w sposób umiejętny i uporządkowany omówiła uzyskane wyniki. Na podstawie skrupulatnie przeanalizowanej literatury, Doktorantka udowodniła zasadność prowadzenia badań nad poszukiwaniem nowego, prostego w oznaczeniu oraz łatwo dostępnego w praktyce nieinwazyjnego „biomarkera”, przydatnego w diagnostyce podstawowej i różnicowej, w monitorowaniu procesu chorobowego oraz ocenie skuteczności leczenia. Co ciekawe, na podstawie przeprowadzonych badań oraz wyników innych naukowców Autorka wysnuła interesującą tezę o względnych zmianach poszczególnych izoform transferyny, uzależnionych od rodzaju patologii, bez wpływu na całkowite stężenie transferyny w surowicy. Stwarza to możliwość opracowania profili izoform transferyny w przebiegu danego schorzenia, co

może mieć ogromne znaczenie diagnostyczno-kliniczne. W dyskusji znajdujemy także informację, iż Autorka dokonała analizy profili izoform transferyny w różnych chorobach o podłożu zapalnym, wskazując na fakt, iż zmiany profilu nie muszą być swoiste tkankowo i mogą wynikać z patogenezы choroby. Szkoda tylko, iż autorka powołuje się w dyskusji na wyniki analizy, której nie opisała w części poświęconej wynikom.

Według mojej opinii, wyniki przeprowadzonych przez Doktorantkę badań są niezwykle interesujące i mogą stanowić preludeum do dalszych badań w tym zakresie. Z pełnym przekonaniem mogę stwierdzić, iż powyższe wyniki mogą okazać się w przyszłości cennymi danymi do opracowania nowych algorytmów diagnozowania i monitorowania chorób wątroby i/lub trzustki.

Na podstawie przeprowadzonych badań i dyskusji Doktorantka wysnuła 5 wniosków. Wnioski logicznie wynikają z uzyskanych wyników i odpowiadają postawionym przez Doktorantkę celom.

Pracę kończy spis literatury, w którym odniesiono się do 54 pozycji literaturowych, głównie obcojęzycznych, co świadczy o rzetelnym studium literatury światowej. Publikacje stanowią doniesienia z lat 1986-2022, z czego ok. 31% stanowiły prace z ostatnich 5 lat.

W rozdziałach 10-11 zamieszczono streszczenia w języku polskim i angielskim, w których Autorka w sposób klarowny i zrozumiały przedstawiła założenia, metodykę oraz uzyskane wyniki.

Na końcu pracy autorka zamieściła również kopie artykułów oryginalnych, stanowiących podstawę dysertacji, kopie zgód właściwych komisji bioetycznych oraz niezbędne oświadczenia. Z oświadczeń współautorów prac w cyklu wynika, iż Pani mgr Agnieszka Mucha wniosła znaczący wkład w powstanie koncepcji pracy, przegląd zgromadzonej literatury, wykonanie oznaczeń, interpretację wyników, napisanie i przygotowanie pracy do publikacji, co zgodnie oceniono na 55% w obu pracach.

Z obowiązku jako Recenzenta przedłożonej rozprawy doktorskiej chciałabym przedłożyć pojedyncze sugestie, które mogą prowadzić do udoskonalenia rozprawy przed złożeniem jest w repozytorium biblioteki Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku.

- a) Nie udało się Doktorantce uniknąć pojedynczych błędów interpunkcyjnych (np. str. 10, 12, 13) oraz błędów składniowych i edytorskich (na str. 10 i 26 użyto niefortunnego sformułowania „oznaczanie całkowitych ich stężeń” zamiast „oznaczania ich całkowitych stężeń”; na str. 14: „poszerzeni” zamiast „poszerzeń”, str. 22 błędna wartość $p=273$).
- b) Na str. 11 nie znalazło się odniesienie do tabeli 1, zaprezentowanej na kolejnej stronie.

- c) Na str. 13 zastosowano skrót ECPW wraz z pełnym rozszerzeniem skrótu, pomimo rozszerzenia go na stronie 12, przy pierwszym wprowadzeniu skrótu.
- d) Na stronie 10 pojawia się nielogiczna konstrukcja zdania. Autorka pisze: „Oznaczanie izoform białek w chorobach może przynieść więcej korzyści diagnostycznych niż oznaczanie całkowitych ich stężeń, poprzez ograniczenie konieczności wykonania badań inwazyjnych, zmniejszenie kosztów i przyspieszenie rozpoznania, co umożliwia wcześniejsze wdrożenie leczenia”. Czytając powyższe zdanie czytelnik dowiadyuje się, iż oznaczanie izoform białek ma tę zaletę, iż nie jest badaniem inwazyjnym, w porównaniu do oznaczania całkowitych stężeń białek. Ponadto, z powyższego wynika, iż oznaczanie izoform jest mniej kosztowne niż oznaczanie całkowitych stężeń białek, co budzi wątpliwości. Zapewne zamiarem Autorki było wskazanie zalet diagnostyki opartej na ocenie izoform białek w porównaniu do wszystkich metod diagnostycznych w omawianych chorobach oraz w globalnym ujęciu pozytywnych aspektów włączenia izoform do diagnostyki.
- e) Z opisu zastosowanych testów statystycznych wynika, iż dane użyte do porównań charakteryzowały się rozkładem odbiegającym od normalnego. Wg mojej wiedzy, zaleca się wówczas przedstawianie danych (tabelarycznych lub na rycinach) w postaci mediany oraz zakresu wartości, a nie średniej oraz odchylenia standardowego, ponieważ mediana i zakres są lepiej obrazującymi miarami (centralną i rozproszenia) w zbiorach o rozkładzie innym niż normalny.
- f) Wniosek 3 stanowi bardziej podsumowanie wyników, aniżeli wniosek. Wynik uzyskany jest na podstawie przeprowadzenia szerokorozumianego eksperymentu, natomiast wniosek ma charakter uogólnienia treści zawartych w wynikach.

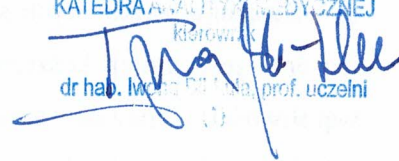
Pragnę jednak stanowczo podkreślić, iż wskazane przeze mnie niedociągnięcia nie ujmują, w żaden sposób, merytorycznej jakości rozprawy doktorskiej, którą oceniam bardzo wysoko.

Podsumowując uważam, iż przedłożona do recenzji dysertacja jest przemyślaną oraz dobrze zaprojektowaną pracą i zawiera wszystkie wymagane elementy rozprawy doktorskiej. Wyniki badań przedstawiono w sposób logiczny, rzetelny, przejrzysty i konsekwentny, co potwierdza umiejętność Doktorantki samodzielnego projektowania i prowadzenia prac badawczych. Potwierdzony przez współautorów, wysoki wkład Autorki w powstanie artykułów, stanowiących cykl prac (55%) świadczy o dużym wkładzie Doktorantki w powstanie tych artykułów.

Stwierdzam zatem, że rozprawa Pani Agnieszki Muchy pt.: „Ocena stężenia izoform transferyny we krwi chorych na pierwotne zapalenie dróg żółciowych oraz zapalenia trzustki”

stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego i spełnia wszystkie wymogi zwyczajowe i ustawowe, stawiane rozprawom doktorskim w postępowaniu o nadanie stopnia doktora nauk medycznych, określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2022r., poz. 574 z późn. zm.). W związku z powyższym wnoszę do Wysokiego Senatu Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku wniosek o dopuszczenie Pani mgr Agnieszki Muchy do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora.

Uniwersyte Medyczny w Białymstoku
KATEDRA FIZJOLOGII MEDYCZNEJ


dr hab. med. Elżbieta prof. uczelni