dr hab. n. med. Ewa Maria Kratz
Katedra i Zakład Chemii i Immunochemii
Wydziału Lekarskiego,
Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu
ul. Bujwida 44a, 50-345 Wrocław
tel. (71) 328 26 95
e-mail: ewa.kratz@umed.wroc.pl

Wrocław, 27.04.2016 r.

RECENZJA
rozprawy doktorskiej mgr Blanki Wolszczak-Biedrzyckiej
pt. „Aktywność i profil izoenzymatyczny dehydrogenazy alkoholowej (ADH) i dehydrogenazy aldehydowej (ALDH) w surowicy chorych ze stłuszczeniem wątroby"

Przedłożoną do recenzji pracę doktorską wykonano w Zakładzie Diagnostyki Biochemicznej Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku. Promotorem jest dr hab. n. med. Wojciech Jelski.

Recenzowana praca ma na celu określenie możliwości zastosowania oznaczeń aktywności dehydrogenazy alkoholowej (i jej izoenzymów) oraz dehydrogenazy aldehydowej w diagnostyce stłuszczenia wątroby.

Stłuszczenie wątroby to jedna z najczęściej występujących patologii wątroby, która może mieć podłoże zarówno alkoholowe jak i niealkoholowe. Alkohol etylowy jest jedną z używek, które najczęściej powodują uzależnienie na świecie - w Polsce ok. 2-2,5 miliona osób nadużywa alkoholu, a prawie 800 tysięcy jest od niego uzależnionych. Alkoholizm stanowi ważny problem medyczny ze względu na liczne zdrowotne konsekwencje, a zarówno alkohol etylowy, jak i jego metabolity, wykazują szkodliwe działanie na wiele narządów i tkanek ludzkiego organizmu, co zostało potwierdzone w licznych badaniach epidemiologicznych. Wątroba jako kluczowy organ metabolizujący alkohol, szczególnie jest podatna na jego działanie.

Metabolizm alkoholu etylowego w wątrobie odbywa się na drodze utleniania w wyniku działania układu dehydrogenazy alkoholowej (ADH), mikrosomalnego układu utleniania etanolu (MEOS) związanego z cytochromem P-450 oraz układu katalazy. Etanol jest metabolizowany głównie pod wpływem dehydrogenazy alkoholowej (ADH) i dehydrogenazy aldehydowej (ALDH), których obecność wykazano w wątrobie. Obydwa te enzymy mogą brać udział w patogenezie zmian stłuszczeniowych w wątrobie oraz ulegać nadmiernemu uwalnianiu do krwi ze zmienionych chorobowo komórek wątroby.

W kontekście tych informacji dochodzimy do celu niniejszej rozprawy doktorskiej. Przedmiotem dysertacji Pani mgr Blanki Wolszczak-Biedrzyckiej były badania, ukierunkowane zarówno na określenie i porównanie aktywności dehydrogenazy alkoholowej i jej izoenzymów oraz dehydrogenazy aldehydowej w surowicy pacjentów ze stłuszczeniem wątroby z aktywnością tych enzymów u osób zdrowych, jak również na ocenę aktywności badanych enzymów we krwi w zależności od: 1) stopnia zaawansowania choroby (dane kliniczne i histopatologiczne) oraz 2) od etiologii stłuszczenia wątroby (alkoholowa, niealkoholowa). Ostatnim celem, w mojej ocenie najważniejszym, jaki postawiła sobie Doktorantka, było określenie wartości diagnostycznej (czułość, swoistość) zmian aktywności w. w. izoenzymów w surowicy chorych.

Badania objęły 38 pacjentów z alkoholowym stłuszczeniem wątroby i 40 pacjentów, u których rozpoznano niealkoholowe stłuszczenie wątroby (wiek 31-75 lat), hospitalizowanych w Klinice Chorób Zakaźnych i Hepatologii Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku. Grupę kontrolną stanowiło 80 osób zdrowych w wieku 30-70 lat. Wszystkie osoby z grupy kontrolnej spożywały alkohol jedynie okazjonalnie (poniżej 20 g etanolu na tydzień). Do oznaczania aktywności ADH I i II oraz ALDH zastosowano metodę spektrofluorymetryczną. Specyficznymi, fluorogennymi substratami były

4-metoksy-1-naftaldehyd dla klasy I i 6-metoksy-2-naftaladehyd dla klasy II ADH (redukcja) i ALDH (utlenianie). Całkowitą aktywność ADH oraz aktywność izoenzymów klasy III i IV mierzono metodą spektrofotometryczną.

Najważniejszym wskaźnikiem, który świadczy o przydatności klinicznej danego parametru, jako markera choroby jest ocena mocy diagnostycznej, której wykładnikiem jest pole pod krzywą ROC. Istnieje zależność między powierzchnią pola pod krzywą a mocą diagnostyczną parametru - im większa powierzchnia pola tym wyższa moc diagnostyczna. Najwyższą mocą diagnostyczną badań w stłuszczeniu wątroby charakteryzował się izoenzym klasy I ADH, dla którego powierzchnia pola AUC wynosiła 0,784. Powierzchnia pola pod krzywą ROC dla ADH II była mniejsza i wynosiła 0,758, a dla całkowitej dehydrogenazy alkoholowej wartość ta wynosiła 0,706. Uzyskane wartości dla badanych parametrów są wyższe od wartości 0,5, która stanowi granicę przydatności diagnostycznej. Powyższe wyniki wskazują, że izoenzymy klasy I, II dehydrogenazy alkoholowej oraz ADH całkowita mogą stać się potencjalnymi parametrami, przydatnymi w diagnostyce laboratoryjnej stłuszczenia wątroby.

Przedstawione wyniki badań sugerują, że znaczący wzrost aktywności ADH II, ADH I oraz całkowitej ADH w surowicy krwi pacjentów ze stłuszczeniem wątroby jest spowodowany uwalnianiem tych izoenzymów ze zmienionych przez stłuszczenie komórek. Godnym podkreślenia jest fakt, że ocena wskaźników przydatności diagnostycznej sugeruje możliwość zastosowania izoenzymu klasy I i II jak również całkowitej ADH, jako markera stłuszczenia wątroby. Badane markery mogą być także pomocne w ocenie etiologii tej choroby. Nie zaobserwowano jednak znaczących różnic w aktywności dehydrogenazy aldehydowej oraz izoenzymów klasy III i IV dehydrogenazy alkoholowej w surowicy chorych w odniesieniu do grupy kontrolnej.

Praca doktorska ma typowy układ edytorski, z zachowaniem właściwych proporcji między poszczególnymi rozdziałami. Jest przejrzysta, opatrzona ładnie wykonanymi rysunkami i tabelami. Piśmiennictwo Doktorantka dobrała umiejętnie (143 pozycje), z czego 87% stanowiły prace anglojęzyczne, a 23% - prace z lat 2011-2016.

We „Wstępie" Doktorantka w sposób bardzo szczegółowy przedstawiła wszystkie niezbędne informacje, które dają podwaliny teoretyczne i pozwalają zarówno na zrozumienie badanego zagadnienia, jak również celowości podjętych badań oraz uzasadnienie konieczności wytypowania specyficznej, czułej i mało inwazyjnej metody diagnostycznej schorzenia jakim jest alkoholowe i niealkoholowe stłuszczenie wątroby. Uzyskane wyniki badań przedstawiono w sposób jasny i zrozumiały, a zastosowane metody analizy statystycznej dobrano prawidłowo. W rozdziale „Dyskusja" zawartych jest wiele cennych informacji ogólnych, które pozwalają na zrozumienie tematyki badawczej jaką zajmowała się Doktorantka, a dyskusja nad otrzymanymi wynikami podkreśla nowatorstwo i wagę jaką tego typu oznaczenia mogą mieć w diagnostyce laboratoryjnej stłuszczenia wątroby. Wnioski sformułowano prawidłowo.

Przedstawiona do recenzji praca jest wartościowa i wnosi szereg nowych informacji, interesujących zarówno dla klinicystów, jak i diagnostów laboratoryjnych. Doktorantka nie ustrzegła się jednak drobnych niedociągnięć, na które czuję się w obowiązku zwrócić uwagę. Nie umniejszają one wartości merytorycznej przedstawionej do recenzji dysertacji, lecz mogą stanowić pomoc przy przygotowywaniu przyszłych opracowań naukowych:

- Doktorantka posługiwała się w pracy skrótami nazw angielskich, dlatego też dla wszystkich użytych skrótów powinny być podane pełne ich brzmienia po angielsku i po polsku, a nie tylko dla niektórych z nich. Dotyczy to zarówno „Wykazu stosowanych skrótów", jak i tekstu pracy, co ułatwiłoby czytanie bez konieczności sięgania do załączonego na początku wykazu. Moje wątpliwości wzbudza rozwinięcie skrótu „LKM" jako „antiliver-kidney microsome" oraz tłumaczenie jako „przeciwciała mikrosomalne przeciwwątrobowe i nerkowe". Według mojej wiedzy skrót „LKM" oznacza „anti-liver-kidney microsome antibody", a trafniejsze tłumaczenie to: „przeciwciała przeciwmikrosomalne wątrobowo-nerkowe". Natomiast „FAD" to „dinukleotyd flawinoadeninowy", a nie „dinukleotyd flawoadenilowy" jak podaje Doktorantka.

- Są dwie rozbieżności między spisem treści a tytułami rozdziałów podanymi w pracy: w spisie treści rozdział 3.1. to „Materiały", a w treści pracy „Materiał"; w spisie treści rozdział 3.2 to „Metody badań", a w treści pracy są to „Metody".
- Każdy rysunek i tabela powinny stanowić odrębną całość i zawierać w opisie wytłumaczenie wszystkich użytych skrótów, niezależnie od tego, że ich wyjaśnienia są podane na początku pracy.
- Str. 8, podkreślone zdania są powtórzeniem tych samych informacji: „Aldehyd octowy, który powstaje w kolejnym etapie ulega utlenieniu w kwas octowy. Reakcja ta jest możliwa dzięki udziałowi dehydrogenazy aldehydowej. Aldehyd octowy przekształca się w produkt końcowy – kwas octowy, który następnie może zostać zmetabolizowany do koenzymu A, natomiast finalnie ulega rozkładowi do CO_2 i H_2O [10]", przy czym w pierwszym z nich sformułowanie: „...utlenieniu w kwas octowy" jest błędne i powinno brzmieć: „...utlenieniu do kwasu octowego".
- Zauważyłam też kilka anglicyzmów: molekuła, masa molekularna, proteina, oksydacja, Total, remodeling. Po polsku powinny one brzmieć odpowiednio: cząsteczka, masa cząsteczkowa, białko, utlenianie, całkowity, przebudowa.
- Str. 17: w treści pracy podana jest informacja: „Dotychczas wykazano istnienie 12 izoenzymów dehydrogenazy aldehydowej", a w tabeli poniżej, na którą powołuje się Doktorantka, jest podanych tylko 10 izoenzymów ALDH.
- Str. 20, po zdaniu: „Hsu i Chang używając techniki odwrotnej transkrypcji oraz reakcji łańcuchowej polimerazy (RT-PCR) wykazali istnienie genu *ALDH-5* odpowiadającego za kodowanie izoenzymu klasy V dehydrogenazy aldehydowej, który był pierwotnie zwany jako *ALDH-χ*.", brak odnośnika do piśmiennictwa, a publikacja tych autorów nie jest uwzględniona w spisie piśmiennictwa.
- Str. 22, podkreślona część zdania: „Wątroba anatomicznie stanowi część układu pokarmowego, natomiast fizjologicznie należy do całego organizmu." jest niejasna.
- Tabela 6: wszystkie angielskie nazwy nie są potrzebne.
- Str. 32, zwrot: „Niektóre publikacje zwracają uwagę na..." jest żargonem, bo to autorzy tych publikacji zwracają uwagę na cokolwiek w swoich doniesieniach.
- Str. 33, odnośnik w tekście do tabeli jest błędny, bo wykaz badań laboratoryjnych w diagnostyce stłuszczenia wątroby jest zawarty w tabeli 7, a nie w tabeli 6, jak podała Doktorantka. Ponadto w tabeli 7 w piątym wierszu podane są wyłącznie angielskie nazwy wymienianych parametrów diagnostycznych.
- Str. 39, odnośnie oznaczania aktywności całkowitej ADH, sformułowanie nie jest jednoznaczne: „Różnicę przekształcono na aktywność wyrażoną w IU/l wykorzystując krzywą kalibracyjną podaną przez autorów metody." Czy oznacza to, że wartości aktywności ADH odczytywano z krzywej kalibracyjnej opublikowanej przez cytowanych autorów, bądź też sporządzonej jednorazowo przez Doktorantkę, czy też do każdej serii oznaczeń sporządzano nową krzywą?
- Nie we wszystkich opisach stosowanych metod oznaczeń podano temperaturę w jakiej przeprowadzano reakcję. Czy to oznacza, że dla każdej serii oznaczeń wynosiła ona 25°C?
- W wielu miejscach pojawia się sformułowanie, że „wykazano istotnie/znamiennie statystyczną różnicę" pomiędzy badanymi grupami (np. pomiędzy wartościami aktywności ADH). Można „wykazać istnienie różnic istotnych statystycznie".
- Podając wartości liczbowe powinno się podawać je według polskich wytycznych, a mianowicie np. „4,5", nie „4.5".
- Str. 47, dla wartości aktywności całkowitej ADH różnice między grupami chorych a grupą kontrolną są istotne statystycznie, a $p<0,001$ (Tabela 8), a nie jak podała Doktorantka $p<0,05$.
- Str. 62, według tabeli 11 wartość NPV dla całkowitej ADH wynosi 69,85%, a nie 69,83%.
- W kilku miejscach brakuje odnośników piśmiennictwa: str. 11, w. 2g; str. 24, w. 5g, 10g, 21g i 25g; str. 34, w. 12g; str. 34-35, w. 2g, 8g, 15g; str. 57, w. 4g.
- W podsumowaniu „Dyskusji" (strona 63) Doktorantka skupiła się na ocenie przydatności klinicznej ADH I, ADH II i całkowitej ADH jako markerów alkoholowego stłuszczenia wątroby. Szkoda, że pominęła ocenę przydatności klinicznej w. w. parametrów w diagnozowaniu niealkoholowego stłuszczenia wątroby.

- W pracy znalazło się też trochę literówek, skrótów myślowych, niezręczności językowych, błędów stylistycznych i interpunkcyjnych, co jednak nie przeszkadza w zrozumieniu sensu przedstawianych treści i nie wpływa na wartość merytoryczną pracy.

Podsumowując stwierdzam, że Doktorantka umiejętnie zorganizowała swój warsztat badawczy, wykazała się dużą pracowitością i starannością w opracowaniu uzyskanych wyników, wykonała bardzo wiele oznaczeń, które pozwoliły na osiągnięcie wszystkich zakładanych celów. Przeprowadzone badania są wartościowe i dały podstawę do wyciągnięcia trzech najważniejszych wniosków:

1. Wyższa całkowita aktywność dehydrogenazy alkoholowej oraz izoenzymów ADH I i ADH II w surowicy krwi pacjentów z alkoholowym i niealkoholowym stłuszczeniem wątroby jest wynikiem uwalniania tych izoenzymów ze stłuszczeniowo zmienionych komórek wątroby.
2. Wyższa aktywność ADH II w surowicy krwi pacjentów z alkoholowym stłuszczeniem wątroby, w porównaniu z pacjentami z niealkoholowym stłuszczeniem wątroby, spowodowana jest uwalnianiem tego izoenzymu z toksycznie uszkodzonych przez alkohol hepatocytów i przemawia za alkoholową etiologią choroby.
3. Najwyższą przydatność diagnostyczną w stłuszczeniu wątroby wykazuje izoenzym klasy I ADH, co stwarza możliwość jego zastosowania w diagnostyce zarówno alkoholowego, jak i niealkoholowego stłuszczenia wątroby.

Uważam, że recenzowana rozprawa doktorska całkowicie spełnia wymagania ustawy o stopniach naukowych i przedstawiam Radzie Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku wniosek o dopuszczenie Pani mgr Blanki Wolszczak-Biedrzyckiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu
KATEDRA I ZAKŁAD CHEMII I IMMUNOCHEMII
adiunkt
dr hab. Ewa Kratz