



UNIwersytet Medyczny

IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH WE WROCŁAWIU

Katedra i Zakład Toksykologii
Kierownik prof. dr hab. Anna Długosz

20.04.2016r., Wrocław

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Blanki Wolszczak-Biedrzyckiej
pt: „AKTYWNOŚĆ I PROFIL IZOENZYMATYCZNY DEHYDROGENAZY ALKOHOŁOWEJ
I DEHYDROGENAZY ALDEHYDOWEJ W SUROWICY CHORYCH ZE STŁUSZCZENIEM WĄTROBY”

Przedstawiona do recenzji praca została wykonana pod kierunkiem Pana dr hab. n. med. Wojciecha Jelskiego, w Zakładzie Diagnostyki Biochemicznej Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku i dotyczy chorych ze stłuszczeniem wątroby.

Choroby wątroby o różnej etiologii są ważnym problemem zdrowotnym i ekonomicznym w społeczeństwach krajów uprzemysłowionych, zwłaszcza ze względu na wysokie koszty leczenia związane często ze zbyt późnym rozpoznaniem i utrudnioną diagnostyką chorób tego narządu. Jak wskazują dane literaturowe choroby wątroby są zagrożeniem dla społeczeństw Europy w XXI wieku. Mimo, iż statystyki pokazują spadek liczby zgonów z powodu przewlekłych chorób wątroby, zwłaszcza indukowanych wirusem hepatitis B, to jednak nadal odnotowuje się szybki wzrost liczby osób ze stłuszczeniową chorobą wątroby. Przez długi czas było ono łączone wyłącznie z chorobą alkoholową, jednak jak pokazują dane z piśmiennictwa, schorzenie to coraz częściej jest również diagnozowane u osób nienadużywających alkoholu, a nawet u abstynentów. Wiązane to jest z epidemią otyłości w krajach uprzemysłowionych oraz wciąż rosnącą liczbą osób z zespołem metabolicznym czy cukrzycą. Choroba stłuszczeniowa wątroby nie dając specyficznych objawów, przebiega często w utajeniu. Mimo postępu naukowo-technicznego, nadal złotym standardem rozpoznania chorób wątroby jest biopsja tego narządu, która jest badaniem inwazyjnym. Z kolei ocena tzw. profilu wątrobowego, czyli aktywności aminotransferaz (alaninowej i asparaginowej) czy gammaglutamylotranspeptydazy, często nieadekwatnie odzwierciedla stan tego narządu, gdyż wzrost aktywności tych enzymów może również

wystąpić w niektórych stanach fizjologicznych lub towarzyszyć chorobom nie związanym bezpośrednio z wątrobą czy być indukowany stosowaniem niektórych leków. Z drugiej zaś strony znany jest fakt, iż przewlekłe wirusowe zapalenie wątroby i stłuszczenie tego narządu mogą z kolei przebiegać z prawidłową aktywnością tych transaminaz. Parametry te nie są wysoce swoiste dla identyfikacji chorób wątroby i nie są również wystarczające do oceny stopnia uszkodzenia tego narządu, również w chorobie stłuszczeniowej, dlatego też podjęte przez Panią mgr Blankę Wolszczak-Biedrzycką badania, które stanowią podstawę jej ubiegania się o nadanie stopnia doktora nauk medycznych, są istotne i doskonale wpisują się w aktualne nurty poszukiwania nowych, o dużej swoistości i niskiej inwazyjności markerów diagnostycznych tego schorzenia. Takimi markerami wydają się być dwa główne enzymy uczestniczące w szlaku przemian alkoholu etylowego, a mianowicie dehydrogenaza alkoholowa (ADH) i dehydrogenaza aldehydowa (ALDH). Ich przydatność w diagnozowaniu osób ze stłuszczeniową chorobą wątroby o podłożu alkoholowym jest znana, natomiast możliwość ich wykorzystania w diagnozowaniu pacjentów z niealkoholowym stłuszczeniem wątroby jest w tym aspekcie ważna i interesująca. Ponadto podjęta przez Doktorantkę tematyka badawcza, doskonale wpisuje się profil badań naukowych Zakładu Diagnostyki Biochemicznej Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku, oraz badań prowadzonych przez promotora, Pana dr hab. Wojciecha Jelskiego.

Pani mgr Blanka Wolszczak-Biedrzycka podjęła się zatem ważnego zadania poszukiwania nowych, mało inwazyjnych markerów choroby stłuszczeniowej wątroby poprzez analizę i ocenę przydatności diagnostycznej pomiarów aktywności dehydrogenazy alkoholowej i jej izoenzymów oraz dehydrogenazy aldehydowej w surowicy krwi osób z tym schorzeniem, co było zasadniczym celem recenzowanej rozprawy doktorskiej. Cel pracy został zrealizowany poprzez systematyczne wykonanie prawidłowo dobranych i zaplanowanych badań, które stanowiły odpowiedź na postawione sobie przez Doktorantkę cztery cele szczegółowe, co zostało opisane w rozdziale drugim – „Cel pracy”, dlatego też nie będę ich w tym miejscu przytaczać.

Przedstawioną mi do recenzji pracę doktorską stanowi 84 numerowanych stron maszynopisu, w typowym, dla dysertacji doktorskich o charakterze doświadczalnym układzie, które stanowi 11 kolejnych rozdziałów, zawierających również dorobek naukowy i Curriculum Vitae doktorantki. Część teoretyczna dysertacji (obejmująca 44 strony) stanowi dobre uzasadnienie dla podjętych badań. Doktorantka, w oparciu o aktualne piśmiennictwo, wprowadza w badany problem, zwięźle przedstawiając szlaki przemian alkoholu etylowego, jako znanego czynnika etiopatogenetycznego w przeważającym odsetku chorób stłuszczeniowych wątroby. Omawia również funkcję, strukturę i mechanizmy działania dwóch najważniejszych dla tego zagadnienia enzymów – dehydrogenazy alkoholowej i jej izoenzymów oraz dehydrogenazy aldehydowej, co ma szczególne znaczenie w aspekcie podjętego tematu badawczego. Przedstawia także zwięźle etiopatogenezę stłuszczenia

wątroby i opisuje objawy kliniczne oraz przedstawia aktualnie metody i proponowane schematy postępowania diagnostycznego służące rozpoznaniu tej choroby. Podsumowując, część teoretyczna stanowi dobrą podstawę do podjętych badań, choć Doktorantka nie uniknęła w tej części pewnych błędów. Zauważalny jest m.in. brak wyraźnie zaznaczonego wprowadzenia lub wstępu zamieszczonego na początku Dysertacji w formie osobnego rozdziału, w którym doktorantka uwypukliłaby argumenty stojące za podjęciem tego tematu badawczego. Drobną uwagę techniczną dotyczy błędnie podanej numeracji w tekście oraz w nagłówku tabeli zamieszczonej na str. 33 (w tekście podano cyfrę 6, w nagłówku tabeli cyfrę 7). Ponadto nie jest konieczne zamieszczanie nazw polskich i angielskich niektórych czynników indukujących stłuszczenie wątroby (tabela 6). Niezbyt zrozumiałe jest podane na str. 29 określenie - „powolny remodeling prawidłowej wątroby”. Należałoby również unikać określenia „poziom” w stosunku do stężenia czy aktywności opisywanych parametrów (np. str. 34).

W części doświadczalnej Pani mgr Blanka Wolszczak-Biedrzycka przedstawiła materiał biologiczny wykorzystany w przeprowadzonych eksperymentach oraz grupy poddane badaniu. Ponadto wyczerpująco przedstawiła zastosowane metody badawcze i wykorzystane wskaźniki diagnostyczne. Jednak w opinii Recenzenta rozdział ten powinien być wzbogacony o dane antropometryczne i kliniczne badanych osób. Ponadto nie podano skąd były rekrutowane osoby do grupy kontrolnej. Uzupełnienie tych danych stanowiłoby ważne dopełnienie tej części pracy oraz stworzyłoby możliwości nowych opracowań statystycznych wyników. Z pewnością Doktorantka będzie mogła wykorzystać te wskazówki w opracowaniu manuskryptu pracy do druku. Należałoby zwłaszcza zwrócić uwagę na wskaźnik masy ciała (BMI) lub parametry gospodarki lipidowej czy ewentualne współwystępowanie cukrzycy w aspekcie wskazywanego ich udziału w rozwoju choroby. Wskazaniem byłoby również uzupełnienie tego rozdziału pracy o opis kryteriów klasyfikacji METAVIR w różnicowaniu stopnia zaawansowania zmian histopatologicznych, co dopełniłoby obrazu.

Doktorantka dobrze zaplanowała i w pełni zrealizowała założone cele. Właściwe wykorzystanie swoistych substratów i metod pomiarowych pozwoliło Doktorantce na uzyskanie obrazu profilu enzymatycznego w analizowanych grupach chorych. Uzyskane wyniki dobrze udokumentowała i przedstawiła w postaci szczegółowych tabel oraz zobrazowała właściwie skonstruowanymi rycinami, co znacząco zwiększyło ich czytelność i ułatwiło zorientowanie się w istocie i ważności zaobserwowanych przez Doktorantkę zmian aktywności enzymów i izoenzymów w badanych grupach chorych. Dokonana ocena statystyczna obiektywizuje poczynione obserwacje, a dobór zastosowanych metod i testów statystycznych jest właściwy. Ważną obserwacją poczynioną przez Panią mgr Blankę Wolszczak-Biedrzycką jest stwierdzenie znamiennych statystycznie różnic w aktywnościach izoenzymu I i II dehydrogenazy alkoholowej oraz całkowitej aktywności tego enzymu w odniesieniu do osób z grupy kontrolnej. Co istotne, wykazała ona różnice o charakterze statystycznie istotnym między chorymi z alkoholowym i niealkoholowym stłuszczeniem wątroby. Te obserwacje zostały właściwie

rozwinęte w dalszej części pracy, gdzie Doktorantka dokonała analizy przydatności diagnostycznej tych parametrów. Recenzent sugeruje, iż w opisie wyników przydatne byłoby podanie stopnia wzrostu (procentu lub krotności) zaobserwowanych zmian dla uwypuklenia i podkreślenia ważności poczynionych obserwacji. Wskazany byłoby ujednolicenie sposobu przedstawiania uzyskanych wyników, które w Tabeli 8 przedstawione są w postaci mediany oraz zakresu, jak mniemam wartości minimalnych i maksymalnych, zaś w tabeli 9 w postaci mediany oraz wartości średniej i wielkości odchylenia standardowego.

Dyskusja została przeprowadzona w sposób właściwy, w oparciu o aktualne dane z piśmiennictwa światowego. W całej dysertacji Doktorantka oparła się na obszernym zakresie piśmiennictwa, które stanowi 143 pozycji bibliograficznych, sięgających nawet bieżącego roku, prawidłowo dobranych i zacytowanych, w przeważającej większości anglojęzycznych, co wskazuje na dużą swobodę doktorantki w posługiwaniu się literaturą fachową z tego zakresu. W początkowej części dyskusji, doktorantka obszernie omówiła aktualnie stosowane metody diagnostyki obrazowej stłuszczeniowej choroby wątroby. Przeprowadzona w tym rozdziale analiza wskazuje na umiejętność Doktorantki do samodzielnej, krytycznej oceny własnych wyników na tle danych publikowanych przez innych autorów. Uzyskane wyniki pozwoliły Doktorantce na wysnucie czterech, dobrze sformułowanych wniosków, które zamykają logicznie przeprowadzoną dyskusję. Uwaga Recenzenta dotyczy jedynie wniosku pierwszego, mówiącego, iż 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, gdzie należałoby raczej użyć określenia „wskazuje na” uwalnianie tych izoenzymów ze stłuszczeniowo zmienionych komórek wątroby, gdyż ostecznego potwierdzenia źródła tych zmian będzie można dokonać po równoległej ich analizie w bioptach wątroby i surowicy krwi. Jedyne uwagi Recenzenta dotyczące tej części pracy odnoszą się do informacji zawartej na stronie 55, gdzie użyto może nieco niefortunnego określenia „postawianie słusznej diagnozy”, gdzie powinno się raczej użyć określenia „właściwej diagnozy”, w stosunku do rozpoznania choroby. Dysertację kończy „Streszczenie”, stanowiące zwięzłe podsumowanie wskazujące na doświadczenie naukowe Doktorantki i trudną umiejętność przedstawienia tylko najważniejszych aspektów badanego zagadnienia.

Z obowiązku Recenzenta, muszę jeszcze zwrócić uwagę na pewne aspekty językowe i stylistyczne przedstawionej mi Dysertacji. Dotyczą one pojawiających się w pracy określeń anglojęzycznych, jak np. molekuły, proteiny, inhibicja czy oksydacja. Należałoby również ujednolicić określenie dotyczące całkowitej aktywności dehydrogenazy alkoholowej, która pojawia się w tekście pracy zarówno jako ADH total, co jest anglikanizmem, oraz jako ADH całkowita. Ponadto nie do końca jest zrozumiały zastosowany pewny skrót myślowy dotyczący „przydatność dwóch grup metod: tzw. algorytmów

diagnostycznych” (str. 61). Pragnę podkreślić, iż wszystkie przedstawione w niniejszej recenzji uwagi nie umniejszają ważności naukowej poczynionych przez Doktorantkę obserwacji, a jedynie będą pomocne w przygotowaniu manuskryptu pracy do druku.

Ważną cechą badań Pani mgr Blanki Wolszczak-Biedrzyckiej, wartą podkreślenia w opinii Recenzenta, jest nie tylko aspekt poznawczy ale również praktyczny poczynionych przez Doktorantkę obserwacji, a zwłaszcza tej, w której słusznie zauważa Ona i wskazuje, iż najwyższą przydatność diagnostyczną zarówno w alkoholowym i niealkoholowym stłuszczeniu wątroby wykazuje izoenzym klasy I dehydrogenazy alkoholowej, co sugeruje możliwość jego zastosowania w diagnostyce stłuszczenia wątroby. Użyte w pracy metody analityczne są możliwe do zaimplementowania w medycznych laboratoriach diagnostycznych, co w perspektywie może pozwolić na wprowadzenia pomiaru aktywności tego izoenzymu, do diagnostyki rutynowej choroby stłuszczeniowej wątroby. Jestem przekonana, że poczynione w pracy doktorskiej obserwacje będą również przydatne w pracy zawodowej Pani magister.

Reasumując, w świetle powyższej, pozytywnej oceny stwierdzam, że recenzowana praca doktorska spełnia wymogi formalne i merytoryczne stawiane w ustawie o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (z dn. 14 marca 2003 r. z późniejszymi zmianami) i świadczy o dobrym przygotowaniu Autorki do samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Upoważnia mnie to do wnioskowania do Wysockiej Rady Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku o dopuszczenie Pani mgr Blanki Wolszczak-Biedrzyckiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu
KATEDRA I ZAKŁAD TOKSYKOLOGII
profesor nadzwyczajny
dr hab. Agnieszka Piwowar