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 Elżbiety Zasimowicz-Majewskiej
pt. „Aktywność i znaczenie diagnostyczne dehydrogenazy alkoholowej i dehydrogenazy aldehydowej w surowicy pacjentów z autoimmunizacyjną chorobą 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 autoimmunizacyjnej choroby wątroby.

Jedną z podstawowych funkcji układu immunologicznego człowieka jest swoiste rozpoznanie i odróżnienie obcych antygenów od własnych, a następnie ich eliminacja, co stanowi jeden z najważniejszych sposobów zabezpieczenia integralności organizmu. Główny układ zgodności tkankowej (HLA) odpowiada za wiązanie i prezentację antygenów komórkom T, a różne receptory na limfocytach T i B są zdolne do rozpoznania czynników infekcyjnych. Produkowane przez organizm człowieka przeciwciała mogą unieszkodliwiać patogeny wnikające do organizmu lub neutralizować ich toksyczne produkty. Choroby autoimmunizacyjne należą do grupy schorzeń, u podstawy których leży proces autoimmunizacji polegający na wytwarzaniu przez układ immunologiczny limfocytów T, B i przeciwciał ukierunkowanych na niszczenie zdrowych komórek własnych tkanek organizmu.

Konsekwencją chorób autoimmunizacyjnych wątroby są zmiany w jej budowie oraz zaburzenia funkcji hepatocytów. Skutkiem tego może być uwalnianie do krwi ze zmienionych komórek wątrobowych różnych enzymów m.in. dehydrogenazy alkoholowej (ADH) i dehydrogenazy aldehydowej (ALDH). Są to polimorficzne enzymy odpowiedzialne głównie za metabolizm etanolu, które na podstawie ich właściwości katalitycznych i lokalizacji narządowej podzielono na klasy. W wątrobie stwierdzono obecność izoenzymów klasy I, II i III dehydrogenazy alkoholowej. Dehydrogenaza aldehydowa występuje głównie w wątrobie. Zmiany aktywności izoenzymów ADH oraz ALDH mogą być przyczyną zakłóceń metabolizmu, powodując w konsekwencji nasilenie procesu chorobowego. Podobnie jak w przypadku innych enzymów indykatorowych, wyraźny wzrost aktywności tych enzymów lub poszczególnych izoenzymów w surowicy pacjentów może mieć zastosowanie w laboratoryjnej diagnostyce autoimmunizacyjnej choroby wątroby.

Powyższe informacje dają podstawy teoretyczne do zrozumienia celu niniejszej rozprawy doktorskiej. Przedmiotem dysertacji Pani mgr Elżbiety Zasimowicz-Majewskiej były badania, które ukierunkowano na określenie profilu izoenzymatycznego ADH i aktywności ALDH w surowicy pacjentów z chorobą autoimmunizacyjną wątroby oraz na ocenę przydatności diagnostycznej badanych izoenzymów w rozpoznawaniu autoimmunizacyjnej choroby wątroby. Cele szczegółowe pracy to: 1) porównanie aktywności dehydrogenazy alkoholowej i jej izoenzymów oraz dehydrogenazy aldehydowej w surowicy pacjentów z chorobą autoimmunizacyjną wątroby z aktywnością badanych enzymów u osób zdrowych; 2) ocena aktywności badanych enzymów we krwi w zależności od typu choroby autoimmunizacyjnej (dane kliniczne i badanie histopatologiczne);

3) określenie wartości diagnostycznej (czułość, swoistość) zmian aktywności ADH i ALDH w surowicy chorych.

Materiał do badań stanowiła surowica krwi 65 pacjentów w wieku 28 - 70 lat, u których rozpoznano autoimmunizacyjną chorobę wątroby (autoimmunizacyjne zapalenie wątroby, pierwotna żółciowa marskość wątroby, pierwotne stwardniejące zapalenie dróg żółciowych), hospitalizowanych w Klinice Chorób Zakaźnych i Hepatologii Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku. Wszyscy pacjenci z grupy badanej spożywali alkohol okazjonalnie (poniżej 20 g etanolu na tydzień). Grupa kontrolna składała się z 60 osób zdrowych w wieku 25 - 65 lat, od których pobrano krew w trakcie rutynowych badań profilaktycznych prowadzonych przez Poradnię Medycyny Pracy Uniwersyteckiego Szpitala Klinicznego w Białymstoku. Wszystkie osoby zaliczone do grupy kontrolnej spożywały alkohol okazjonalnie. Do oznaczenia 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 klinicznej przydatności danego parametru jako markera choroby, jest ocena mocy diagnostycznej testu. Wykładnikiem mocy diagnostycznej jest pole pod krzywą ROC. Istnieje zależność między powierzchnią pola pod krzywą a diagnostyczną mocą parametru - im większe pole pod krzywą tym wyższa moc diagnostyczna. Najwyższą moc diagnostyczną badań w autoimmunizacyjnym zapaleniu wątroby wykazał izoenzym klasy I ADH, dla którego powierzchnia pola AUC wynosiła 0,763. Pole pod krzywą ROC dla całkowitej ADH było nieco mniejsze - 0,731. W przypadku pierwotnej żółciowej marskości wątroby najwyższą mocą diagnostyczną cechował się izoenzym ADH klasy I, dla którego pole AUC wynosiło 0,751, natomiast pole pod krzywą ROC dla całkowitej ADH było nieco mniejsze i miało wartość 0,714. Jeśli chodzi o pierwotne stwardniejące zapalenie dróg żółciowych stwierdzono że najwyższą mocą diagnostyczną charakteryzuje się ADH I, dla którego powierzchnia pola AUC wynosiła 0,744. Pole pod krzywą ROC dla całkowitej ADH było nieco mniejsze i miało wartość 0,708. Uzyskane wartości badanych parametrów są wyższe od wartości 0,5, która stanowi granicę przydatności diagnostycznej. Przedstawione wyniki wskazują, że izoenzymy klasy I ADH, oraz całkowitej ADH są potencjalnymi parametrami, które można wykorzystać w diagnostyce laboratoryjnej chorób autoimmunizacyjnych wątroby. Na podstawie uzyskanych wyników badań wykazano, że znaczący wzrost aktywności ADH I, oraz całkowitej ADH w surowicy krwi pacjentów z autoimmunologiczną chorobą wątroby jest spowodowany uwalnianiem tych izoenzymów ze zmienionych poprzez proces immunologiczny komórek wątroby. Ocena wskaźników przydatności diagnostycznej sugeruje możliwość zastosowania izoenzymu klasy I oraz całkowitej ADH jako markera uszkodzenia hepatocytów w chorobach autoimmunizacyjnych wątroby.

Praca doktorska ma typowy układ edytorski, z właściwymi proporcjami między poszczególnymi rozdziałami. Jest przejrzysta, uzupełniona ładnie wykonanymi rysunkami i tabelami. Umiejętnie dobrane piśmiennictwo, z którego korzystała Doktorantka (143 pozycje), w 88% stanowiły prace anglojęzyczne, a w 20% - prace z lat 2011-2016.

We „Wstępie" Doktorantka w sposób bardzo szczegółowy wprowadziła w tematykę badanego zagadnienia, dając podbudowę teoretyczną, która pozwala zarówno na zrozumienie badanego zagadnienia, jak również wyjaśnia cel podjętych badań oraz stanowi uzasadnienie konieczności wytypowania specyficznej, czułej i mało inwazyjnej metody diagnostycznej schorzenia jakim jest autoimmunizacyjna choroba wątroby. Otrzymane 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 poprowadzenie dyskusji nad otrzymanymi wynikami podkreśla nowatorstwo oraz wagę jaką tego typu oznaczenia mogą mieć w diagnostyce laboratoryjnej autoimmunizacyjnej choroby wątroby. Wnioski sformułowano umiejętnie.

Przedstawiona dysertacja jest wartościowa, a treści w niej zawarte mogą stanowić interesujące źródło informacji zarówno dla klinicystów, jak i diagnostów laboratoryjnych. Doktorantka

nie ustrzegła się jednak drobnych niedociągnięć, na które pozwolę sobie zwrócić uwagę. Nie umniejszają one wartości merytorycznej przedstawionej pracy, a mogą stać się pomoce 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. ICAM to wewnątrzkomórkowa cząsteczka adhezyjna. Wątpliwości wzbudza rozwinięcie skrótu „LKM" jako „liver-kidney microsomal antibodies". Według mojej wiedzy skrót „LKM" oznacza „anti-liver-kidney microsome antibody".
- Str. 6, w. 2d: cholesterol ulega utlenieniu do kwasów żółciowych, nie rozkładowi.
- Str. 9, zdanie: „AIH jest chorobą rzadką, a występuje z częstością 1,1-1,9 przypadków/100 000 pacjentów" jest niejasne. O jakich pacjentów chodzi?
- Str. 11, zdanie: „Później wyłączono chorych z seropozytywnych do anty HCV z grona chorych na AIH typu 2." jest niejasne.
- Jest jedna drobna rozbieżność między spisem treści a tytułem rozdziału podanym w pracy: w spisie treści rozdział 4.2. to „Ocena aktywności ADH i ALDH w surowicy pacjentów z pierwotną marskością żółciową wątroby", a w treści pracy jest „Ocena aktywności ADH i ALDH w surowicy pacjentów z pierwotną żółciową marskością wątroby".
- Każdy rysunek i tabela powinny stanowić odrębną całość, zawierając w opisie wytłumaczenie wszystkich użytych skrótów, niezależnie od tego, że ich wyjaśnienia są podane na początku pracy.
- Brakuje odniesienia w tekście do tabeli 1.
- Str. 32, zdanie: „Izoenzymy klasy VII i VIII wyróżniają się bardzo dużym podobieństwem, rzędu 87%" jest niejasne.
- W tabeli 5 jedna z komórek jest pusta. Brakuje słowa „parametr" lub podobnego w znaczeniu.
- Zauważyłam też kilka anglicyzmów: proteina, oksydacja, total, molekuła oraz zwrot „na bazie". Po polsku powinny one brzmieć odpowiednio: białko, utlenianie, całkowity, cząsteczka oraz „na podstawie". W niektórych miejscach tekstu daje się też zauważyć angielska składnia.
- Str. 41, odnośnie oznaczania aktywności całkowitej ADH, sformułowanie nie jest jednoznaczne: „Miarą aktywności była różnica absorbancji pomiędzy referencyjną a badaną próbą. Wielkość ta została przekształcana na aktywność wyrażoną w IU/l z wykorzystaniem krzywej kalibracyjnej podanej 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 kilku 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. „3,5", nie „3.5".
- W tabelach 6, 7, 8, 9, kolumna pierwsza z prawej, opis „zakres" i „średnia" powinny być zamienione miejscami.
- Str. 47, w. 4d, jest „p<0,05", powinno być: „p<0,01", jak podano w tabeli 6.
- Str. 53, zdanie: „Dehydrogenaza aldehydowa również nie wykazuje znamiennych statystycznie różnic aktywności w surowicy chorych z chorobami autoimmunizacyjnymi wątroby" jest niejasne. W stosunku do której grupy badanej nie wykazano istnienia różnic istotnych statystycznie?
- Str. 59, zdanie: „Autoimmunizacja to immunologiczna reakcja polegająca na niszczeniu własnych antygenów organizmu i związana jest z utratą zdolności układu odpornościowego do rozpoznawania zarówno „własnych" jak i „obcych" antygenów" jest mylące, bo z autoimmunizacją mamy do czynienia wtedy, gdy antygeny „własne" rozpoznawane są jako „obce".

- Str. 66, zdanie: „W czasie drugiego etapu inkubacji dochodzi do reakcji z nimi związanych z enzymem przeciwciał skierowane anty-ludzkim immunoglobulinom IgG" jest niejasne.
- W wielu miejscach brakuje odnośników piśmiennictwa: str. 8, w. 6d; str. 9, w. 5d; str. 17, w. 5g; str. 19, w. 10d; str. 20, w. 18g, 22g; str. 21, w. 12d; str. 22, w. 10g, 4d; str. 23, w. 17g; str. 24, w. 3g; str. 25, w. 14g; str. 26, w. 12d; str. 27, w. 5g, 11d; str. 28, w. 4g, 9g; str. 30, w. 13d; str. 31, w. 12g; str. 33, w. 7d; str. 34, w. 9g, 8d; str. 35, w. 2g, 9g; str. 36, w. 5d; str. 60, w. 12g; str. 65, w. 8g, 6d.
- Dane dwóch pozycji piśmiennictwa są niekompletne: [3] Postgrad Med J. 2016 Apr;92(1086):223-34; [33] Hepat Mon. 2015 Jun 23;15(6):e29043;
- 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 wykazała się umiejętnością w zorganizowaniu warsztatu badawczego, mnogość przeprowadzonych oznaczeń wymagała pracowitości, a opracowanie uzyskanych wyników dużej staranności. Pani mgr Elżbieta Zasimowicz-Majewska osiągnęła wszystkie założone cele, a przeprowadzone badania są wartościowe i dały podstawę do wyciągnięcia trzech najważniejszych wniosków:

1. Wyższa aktywność całkowita ADH oraz aktywność ADH klasy I w surowicy krwi pacjentów z autoimmunizacyjną chorobą wątroby jest wynikiem uwalniania tego enzymu ze zniszczonych na drodze procesu immunologicznego komórek wątroby.
2. Brak różnic istotnych statystycznie w aktywności ADH i jej izoenzymów oraz ALDH w surowicy chorych z poszczególnymi chorobami autoimmunizacyjnymi wątroby świadczy o braku zależności stopnia uszkodzenia hepatocytów od rodzaju choroby.
3. Najwyższą przydatność diagnostyczną w poszczególnych analizowanych chorobach autoimmunizacyjnych wykazuje izoenzym ADH klasy I, co wskazuje na możliwość jego wykorzystania w diagnostyce laboratoryjnej autoimmunizacyjnych chorób wątroby.

Recenzowana przeze mnie 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 Elżbiety Zasimowicz-Majewskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

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