



UNIwersytet Medyczny

IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH WE WROCŁAWIU

Wydział Farmaceutyczny

Katedra Diagnostyki Laboratoryjnej

Kierownik: **dr hab. Ewa M. Kratz, prof. UMW**
tel. 71 784 01 52, e-mail: ewa.kratz@umw.edu.pl

Wrocław, 28.04.2022 r.

RECENZJA

rozprawy doktorskiej lek. Joanny Piechoty

pt. „Przydatność diagnostyczna oznaczeń dehydrogenazy alkoholowej (ADH) i jej izoenzymów oraz dehydrogenazy aldehydowej (ALDH) w cholestazie ciężarnych”

Rozprawa doktorska w oparciu o cykl 3 publikacji naukowych

Badania, których wyniki przedstawiono w przedłożonej do recenzji rozprawie doktorskiej, wykonano w Zakładzie Diagnostyki Biochemicznej Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku, którego kierownikiem jest Pani prof. dr hab. n. med. Barbara Mroczo. **Promotorem pracy doktorskiej jest dr hab. n. med. Wojciech Jelski.**

Przedstawiona do recenzji praca powstała w oparciu o cykl trzech powiązanych tematycznie artykułów opublikowanych w latach 2020-2022, jednego przeglądowego oraz dwóch oryginalnych przedstawiających wyniki przeprowadzonych badań eksperymentalnych. Każdy z artykułów wchodzących w skład cyklu został opublikowany w recenzowanym czasopiśmie anglojęzycznym o wysokim współczynniku wpływu IF:

- Intrahepatic Cholestasis in Pregnancy: Review of the Literature. **Piechota J**, Jelski W. Journal of Clinical Medicine 2020, 9: 1360-1366. **IF 4.242, MNiSW: 140 pkt.** (praca przeglądowa)
- The Alterations in Alcohol Dehydrogenase Activity in the Sera of Women With Intrahepatic Cholestasis of Pregnancy. Jelski W, **Piechota J**, Orywal K, Mroczo B., Anticancer Research 2020, 4: 1997-2001. **IF 2.480, MNiSW: 70 pkt.** (praca oryginalna)
- The comparison of total bile acid concentration and alcohol dehydrogenase activity as markers of intrahepatic cholestasis of pregnancy. **Piechota J**, Jelski W, Orywal K, Mroczo B. Acta Biochimica Polonica 2022, 69:173-176. **IF 2.149, MNiSW: 70 pkt.** (praca oryginalna)

Łączny IF z cyklu: 8.871, 280 pkt. MNiSW

Udział Doktorantki w powstawaniu powyższych artykułów jest znaczący i wynosi odpowiednio 70%, 60% i 60%, co w mojej ocenie świadczy o bardzo dużym zaangażowaniu Doktorantki w zaplanowanie badań, wykonanie oznaczeń oraz w analizę ich wyników, interpretację i opisanie w formie publikacji. Warto również podkreślić, że Doktorantka w dwóch w/w artykułach jest pierwszym autorem.

Całość dorobku naukowego Pani Joanny Piechoty obejmuje pięć anglojęzycznych artykułów opublikowanych w recenzowanych czasopismach, z czego cztery to publikacje oryginalne, o łącznym współczynniku wpływu IF 11.761, 320 pkt. MNiSW.

Biorąc pod uwagę fakt, że przedstawiona do recenzji dysertacja została przygotowana w oparciu o cykl artykułów opublikowanych w recenzowanych czasopismach naukowych o zasięgu międzynarodowym, należy zaznaczyć, że obecna recenzja będzie stanowiła raczej podsumowanie przeprowadzonych przez Doktorantkę badań i ocenę spełnienia wymogów stawianych pracom doktorskim. Postaram się także podzielić swoimi przemyśleniami i uwagami związanymi z przygotowaną przez Doktorantkę dysertacją.

W swoich badaniach Doktorantka postanowiła sprawdzić potencjalną przydatność oznaczeń dehydrogenazy alkoholowej (ADH) i jej izoenzymów oraz dehydrogenazy aldehydowej (ALDH) w diagnostyce cholestazy ciężarnych, co stanowi nowe spojrzenie na możliwości poszerzenia panelu parametrów diagnostycznych związanych z rozwojem tej choroby. W organizmie człowieka dehydrogenaza alkoholowa występuje w postaci kilkunastu heterogennych izoenzymów, spośród których można wyróżnić pięć klas (ADH I – ADH V), umiejscowionych w różnych narządach, mających zdolność utleniania alkoholi zarówno alifatycznych jak i aromatycznych. Podstawową funkcją biologiczną tego enzymu jest utlenianie alkoholu etylowego oraz udział w biotransformacji wielu ważnych fizjologicznie substancji, takich jak retinol, czy serotonina. Ponad 90% tego enzymu jest zlokalizowane w cytoplazmie komórek wątroby, a hepatocyty są najbogatszym źródłem ADH I. ADH II jest izoenzymem swoistym narządowo dla wątroby, w przeciwieństwie do izoenzymu ADH III, który występuje we wszystkich narządach. ADH IV, ze względu na lokalizację, określana jest jako izoenzym żółdkowy, a obecność izoenzymu klasy V stwierdzono w wątrobie oraz nabłonku błony śluzowej żołądka.

Dehydrogenaza aldehydowa jest wysoce nieswoistym enzymem, który katalizuje reakcje przemian różnych aldehydów. ALDH odpowiada za utlenianie 90% aldehydu octowego powstającego w metabolizmie alkoholu etylowego. W organizmie człowieka enzym ten występuje w postaci kilkunastu izoenzymów o różnej lokalizacji, podzielonych na klasy, spośród których najważniejszą rolę pełnią izoenzymy klas I – IV.

Uważa się, że pomiar aktywności zarówno ADH, jak i ALDH może mieć znaczenie w diagnozowaniu wielu chorób wątroby i innych narządów. Zaburzenia aktywności tych enzymów mogą powodować wiele zmian metabolicznych, co prowadzi do nasilenia procesu chorobowego. W efekcie toksycznego uszkodzenia komórek wątroby dochodzi do uwalniania izoenzymu ADH klasy I oraz wzrostu jego aktywności w surowicy krwi osób chorych. U alkoholików zmiana aktywności tego izoenzymu jest wprost proporcjonalna do stopnia uszkodzenia narządu. Zmiany aktywności dehydrogenazy alkoholowej mogą być również przydatne w monitorowaniu skuteczności terapii alkoholowej choroby wątroby. W przypadku aktywności izoenzymów ADH I i ADH II stwierdzono dodatnią korelację z aminotransferazą asparaginianową (AST) i alaninową (ALT), które są powszechnie uznanymi parametrami mającymi zastosowanie w diagnostyce chorób wątroby.

Doktorantka skupiła swoje zainteresowanie wokół diagnostyki wewnątrzwątrobowej cholestazy ciężarnych (ang. intrahepatic cholestasis of pregnancy, ICP), która stanowi najczęstszą, ściśle związaną z ciążą, chorobę wątroby u kobiet, pojawiającą się zwykle w drugim lub trzecim trymestrze ciąży i ustępującą samoistnie po porodzie. W Polsce częstość występowania ICP jest szacowana na około 1-4 %, a jej etiologia nie jest do końca poznana - bierze się pod uwagę udział czynników genetycznych,

hormonalnych, a także środowiskowych. Wystąpienie choroby u ciężarnej wiąże się ze zwiększonym ryzykiem powikłań okołoporodowych, takich jak zaburzenia oddechowe, przedwczesny poród, a nawet martwe urodzenie. Obecnie nie ma jednego wiarygodnego testu pozwalającego w sposób jednoznaczny na różnicowanie przypadków ICP od innych chorób wątroby. Najbardziej czułym markerem biochemicznym stosowanym w diagnostyce ICP jest całkowite stężenie kwasów żółciowych, które może stanowić pierwszy lub jedyny biomarker wykrywany laboratoryjnie.

W trakcie ciąży w wątrobie matki dochodzi do szeregu zmian zarówno fizjologicznych jak i patologicznych, które mogą prowadzić do zmian aktywności enzymów w komórkach wątroby i ich uwalniania do krwi. W przebiegu chorób wątroby obserwuje się wzrost aktywności enzymów cytoplazmatycznych w surowicy krwi, w tym dehydrogenazy alkoholowej i dehydrogenazy aldehydowej, które wykazują także wysokie aktywności w hepatocytach. ADH i ALDH odgrywają istotną rolę w metabolizmie szeregu ważnych substancji biologicznie czynnych oraz są wskaźnikiem uszkodzenia komórek wątroby. W związku z powyższym, celem założonym przez Doktorantkę było określenie profilu izoenzymów ADH i aktywności ALDH w surowicach pacjentek z ICP oraz ocena przydatności diagnostycznej badanych izoenzymów w rozpoznawaniu wewnątrzwątrobowej cholestazy ciężarnych.

Wyznaczono następujące cele szczegółowe:

1. Oznaczenie aktywności ADH i jej izoenzymów oraz ALDH w surowicy ciężarnych, u których wystąpiła cholestaza wewnątrzwątrobowa, a następnie porównanie otrzymanych wyników z tymi otrzymanymi dla grupy kontrolnej składającej się ze zdrowych kobiet ciężarnych oraz nie będących w ciąży.
2. Porównanie oznaczonych aktywności analizowanych enzymów zarówno ze stężeniami klasycznego markera wewnątrzwątrobowej cholestazy ciężarnych, którym jest całkowite stężenie kwasów żółciowych, jak również z aktywnościami enzymatycznych markerów ICP – aminotransferazy alaninowej (ALT) i asparaginianowej (AST), fosfatazy alkalicznej (ALP) i γ -glutamylotransferazy (γ -GT).

Materiał do badań stanowiły surowice krwi pochodzące od 80 kobiet w II lub III trymestrze ciąży (19-40 lat), u których rozpoznano wewnątrzwątrobową cholestazę ciężarnych na podstawie badań klinicznych i laboratoryjnych (całkowite stężenie kwasów żółciowych, aktywność transaminaz), hospitalizowanych w II Klinice Położnictwa i Ginekologii Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego. Do kryteriów włączenia zaliczono świąd skóry rozpoczynający się w drugim lub trzecim trymestrze ciąży i podwyższenie całkowitego stężenia kwasów żółciowych w surowicy ($>10 \mu\text{mol/l}$). Kryteria wykluczenia stanowiły: przewlekła choroba wątroby i infekcja wirusowa wątroby (HAV, HBV lub HCV), stan przedrzucawkowy, hemoliza, podwyższona aktywność enzymów wątrobowych, niska liczba płytek krwi (HELLP) oraz ostre stłuszczenie wątroby w ciąży (AFLP). Otrzymane wyniki oznaczeń porównano z wynikami otrzymanymi dla 80 zdrowych kobiet w ciąży (19-39 lat) w drugim lub trzecim trymestrze ciąży oraz dla 40 zdrowych kobiet niebędących w ciąży (20-42 lata).

Aktywność izoenzymów ADH klasy I i II oraz aktywność ALDH oznaczono metodą spektrofлуorometryczną. Do pomiaru aktywności ADH klasy III i IV oraz całkowitej aktywności ADH wykorzystano metody spektrofotometryczne. Aktywności aminotransferazy alaninowej (ALT) i asparaginianowej (AST), fosfatazy alkalicznej (ALP), γ -glutamylotransferazy (γ -GT) oraz całkowite stężenie kwasów żółciowych (TBA) oznaczono za pomocą gotowych zestawów odczynników firmy Abbott na analizatorze biochemicznym ALINITY (Abbott).

recenzenta pozwolę sobie najważniejsze z nich wymienić, co ma na celu pomoc w unikaniu pewnych niezręczności w przyszłości:

- Na stronie tytułowej widnieje rok 2021, co zapewne jest przeoczeniem
- Str. 4 i str. 51 – nie można pisać o oświadczeniach współautorów rozprawy doktorskiej, gdyż z założenia rozprawa doktorska dotyczy wyłącznie jednej osoby – doktoranta. Powinno być: oświadczenia współautorów artykułów wchodzących w skład cyklu publikacji stanowiących rozprawę doktorską
- Str. 7 – napisano, że izoenzym ADH klasy V zbudowany jest z podjednostek o nieznanym składzie, a podany odnośnik piśmiennictwa jest z roku 2001. Mam zatem pytanie, czy sprawdzała Pani, czy przez ten okres ponad 20 lat nadal niczego się nie dowiedziano na temat składu podjednostkowego izoenzymu ADH klasy V?
- Str. 11 - podając jednostki stężeń należy stosować zapis ogólnie przyjęty, czyli np. $\mu\text{M/L}$, a nie mikromole/l, i należy te zapisy ujednolicić, a nie stosować naprzemiennie
- Przy wszystkich stosowanych w treści rozprawy skrótach nazw angielskich powinny być podane nazwy angielskie, oprócz ich polskich odpowiedników, co dotyczy zarówno wykazu skrótów, jak i części rozprawy doktorskiej w języku polskim
- Str. 24 i 26 – piszemy o celu badań (purpose of this study), a nie o celu pracy (purpose of this paper), mając na myśli publikację, bo aby mógł powstać artykuł potrzebne są badania, a więc to ich realizacja jest celem nadrzędnym
- Piszemy o różnicach, które są istotnie wyższe/niższe, a nie statystycznie istotnie wyższe/niższe, gdyż już samo słowo „istotnie” świadczy o tym, że jest to istotność statystyczna.

Podsumowując stwierdzam, że Doktorantka umiejętnie zorganizowała swój warsztat badawczy, wykazała się dużą pracowitością i starannością w opracowaniu uzyskanych wyników, wykonała oznaczenia i przeanalizowała otrzymane wyniki dla łącznie 11 parametrów, a swoje badania przeprowadziła na reprezentatywnych pod względem ilościowym i porównywalnych wiekowo grupach badanych, co pozwoliło na osiągnięcie wszystkich zakładanych celów. Przeprowadzone badania są wartościowe i dały podstawę do wyciągnięcia dwóch najważniejszych wniosków:

1. Wzrost aktywności izoenzymu klasy I ADH, a w konsekwencji aktywności całkowitej ADH w surowicach pacjentek cierpiących na wewnątrzwątrobową cholestazę ciężarnych, jest spowodowany uwalnianiem ADH I ze zmienionych chorobowo komórek wątroby.
2. Dodatnia korelacja między aktywnością całkowitą ADH i aktywnością izoenzymu klasy I ADH a stężeniem całkowitym kwasów żółciowych (ang. total bile acids, TBA) wskazuje na przydatność diagnostyczną oznaczeń ADH w wykrywaniu wewnątrzwątrobowej cholestazy ciężarnych.

Nasuwa się jednak pytanie dlaczego we wnioskach pominięto fakt, że wykazano również istnienie istotnych dodatnich korelacji między aktywnościami ADH całkowitej i izoenzymu klasy I a aktywnościami aminotransferazy asparaginianowej i alaninowej? Proszę o wyjaśnienie.

W mojej opinii 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 lek. Joanny Piechoty do dalszych etapów przewodu doktorskiego.