

Katowice 19.05.2022r.

Prof. dr hab. n. med. Rafał Stojko

Kierownik Katedry i Oddziału Klinicznego Ginekologii, Położnictwa i Ginekologii Onkologicznej

Wydział Nauk o Zdrowiu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

e-mail: rafal@czstojko.pl

tel. 32-461-63-70

Sz. P.

Prof. dr hab. Wojciech Miłyk

Dziekan

Kolegium Nauk Farmaceutycznych

Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku

W załączeniu przesyłam recenzję rozprawy doktorskiej lek. Joanny Piechoty na temat: *"Przydatność diagnostyczna oznaczeń dehydrogenazy alkoholowej (ADH) i jej izoenzymów oraz dehydrogenazy aldehydowej (ALDH) w cholestazie ciężarnych"*.

Z wyrazami szacunku

Prof. dr hab. n. med. Rafał Stojko

Katowice, 19.05.2022 r.

Prof. dr hab. n. med. Rafał Stojko

Kierownik Katedry i Oddziału Klinicznego Ginekologii, Położnictwa i Ginekologii Onkologicznej

Wydział Nauk o Zdrowiu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

e-mail: rafal@czstojko.pl

tel. 32-461-63-70

Recenzja

rozprawy doktorskiej lek. Joanny Piechoty na temat:

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

Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska w oparciu o cykl publikacji naukowych w dziedzinie nauki medycznej i nauki o zdrowiu została przygotowana w formie wydruku obejmującego 56 stron w układzie typowym dla tego typu prac, zawierającego wykaz użytych w pracy skrótów, wstęp, założenia i cel pracy, opis materiału badawczego i zastosowanej metodologii badań, opis wyników badań, dyskusję, wnioski, piśmiennictwo, streszczenie w języku polskim i angielskim oraz załączone publikacje wraz z oświadczeniami współautorów. Niniejsza rozprawa powstała w oparciu o publikację dwóch prac oryginalnych: „*The alterations in alcohol dehydrogenase activity in the sera of women with intrahepatic cholestasis of pregnancy*” opublikowanej w czasopiśmie Anticancer Research oraz „*The comparison of total bile acid concentration and alcohol dehydrogenase activity as markers of intrahepatic cholestasis of pregnancy*” opublikowanej w Acta Biochimica Polonica. Trzecią publikacją włączoną do rozprawy była praca przeglądowa pt. „*Intrahepatic cholestasis in Pregnancy – Review of the literature*”, która ukazała się w Journal of Clinical Medicine. Łączna wartość Impact Factor publikacji włączonych do rozprawy doktorskiej wynosi: 8,870 oraz 280 punktów MNiSW.

Wybór tematu jest trafny, dotyczy bowiem wewnątrzwątrobowej cholestazy ciężarnych (ICP), która stanowi najczęstszą odwracalną chorobę wątroby ściśle powiązaną z ciążą. Częstość występowania ICP w ostatnich latach spada, niemniej w krajach Europy i Ameryki Północnej nadal wynosi pomiędzy 1-2%. Choroba samoistnie ustępuje po rozwiązaniu, ale w kolejnych ciążach (45-90%) zwykle ujawnia się ponownie, przybierając bardziej nasiloną postać. Wewnątrzwątrobowa cholestaza ciężarnych po raz pierwszy została opisana przez Ahlfelda w 1883 roku. Do zaburzeń czynności wątroby w ICP dochodzi najczęściej w trzecim trymestrze ciąży, częściej chorują kobiety starsze i w ciąży mnogiej. Istotę choroby stanowią zaburzenia w przemieszczaniu składników żółci od podstawno bocznej części hepatocytu do jego bieguna żółciowego. Wiele związków (hormony, cytokiny, leki, endotoksyny) może wpływać na zaburzenie transportu w hepatocycie, zaburzać transport śródkomórkowy i zwiększać przepuszczalność złącz międzykomórkowych, czego efektem jest pojawienie się składników żółci we krwi obwodowej. Etiologia ICP jest wieloczynnikowa z udziałem zaburzeń hormonalnych, genetycznych oraz środowiskowych.

Rozpoznanie cholestazy ciężarnych opiera się na obecności:

- Świądu
- Podwyższonych wartości kwasów żółciowych w surowicy krwi ($>10 \mu\text{mol/l}$) oraz aminotransferaz: asparaginianowej, alaninowej i γ -glutamylotranspeptydazy (AspAt, AlAt i GGTP)
- Spontanicznego ustąpienia objawów w ciągu 2-3 tygodni po porodzie
- Braku innych chorób powodujących świąd i żółtaczkę

Biopsja wątroby ani badanie histopatologiczne nie jest elementem diagnostycznym koniecznym dla postawienia rozpoznania. Świąd bez wysypki skórnej zwykle rozpoczyna się w drugim lub trzecim trymestrze ciąży (po 30 tygodniu), nasila się zazwyczaj w nocy, ma charakter rozlany i często obejmuje wewnętrzne powierzchnie dłoni oraz podeszwy stóp. Największą nieprawidłowością laboratoryjną w ICP jest wzrost stężenia w surowicy kwasów żółciowych (BA), który może być pierwszą i jedyną nieprawidłowością laboratoryjną. Stężenie kwasu cholowego zwiększa się bardziej niż kwasu chenodeoksycholowego, powodując znaczne podniesienie stosunku kwasu cholowego/chenodeoksycholowego w porównaniu do kobiet w ciąży bez ICP. Zwykle za punkt odcięcia dla wartości nieprawidłowych przyjmuje się stężenie przekraczające $10 \mu\text{mol/l}$. Uznaje się, że stężenie BA wyższe niż $40 \mu\text{mol/l}$ pozwala rozpoznać ciężką postać

ICP związaną z ryzykiem porodu przedwczesnego, obecnością zielonego płynu owodniowego, porodu operacyjnego i niskiej oceny noworodka w skali Apgar (<7pkt).

Część autorów uważa, że najczulszym ze standardowych badań jest oznaczenie aktywności AlAt (60- 85%), inni autorzy za patognomoniczne uważają nieprawidłowe wartości (4-krotny wzrost) fosfatazy alkalicznej (60%) i bilirubiny (14%). Fosfataza alkaliczna jest markerem o niskiej wartości diagnostycznej ze względu na jej produkcję przez łożysko i kości. Stężenie aminotransferaz (AspAt, AlAt) może być podwyższone 2-10-krotnie u pacjentek ze świądem, natomiast stężenie γ -glutamylotranspeptydazy (GGTP) może być podwyższone lub prawidłowe u połowy pacjentek z ICP. Jak widać, nie istnieje idealny marker, który pozwalałby nam na stosunkowo wczesną i precyzyjną diagnostykę cholestazy ciężarnych, stąd potrzeba dalszych badań, który dają nadzieję na znalezienie takiego czynnika, co zostało skwapliwie zauważone przez autorkę pracy.

Cholestaza stanowi problem medyczny przede wszystkim ze względu na zagrożenia dla płodu. Etiologia powikłań u płodu związanych z ICP jest słabo poznana, ale uważa się, że wynika ze zwiększonego przepływu kwasów żółciowych do krążenia płodowego, jak wskazuje na to podwyższony ich poziom w płynie owodniowym, w surowicy krwi pępowinowej i smółce. Postępowanie położnicze obejmuje: zmniejszenie objawów i zaburzeń biochemicznych u matki oraz zminimalizowanie ryzyka zagrożenia płodu, porodu przedwczesnego i nagłej śmierci płodu. Proponowano wiele strategii dla poprawy wyników położniczych i chociaż nie znaleziono idealnego sposobu nadzoru nad płodem w ICP, ściśle monitorowanie jego stanu jest zalecane we wszystkich przypadkach (KTG, USG oraz liczenie ruchów płodu przez ciężarną).

Ciężarna z rozpoznaną ICP powinna być niezwłocznie hospitalizowana oraz poddana ścisłej diagnostyce i intensywnemu leczeniu. Celem leczenia farmakologicznego w ICP jest zmniejszenie objawów u matki oraz poprawa wyników położniczych. Podstawowym lekiem stosowanym w terapii cholestazy ciężarnych jest kwas ursodeoksycholowy, który należy do naturalnie występujących hydrofilowych kwasów żółciowych; u ludzi stanowi ok. 3% całej puli kwasów żółciowych. Stosowany jest z pozytywnym efektem w leczeniu pierwotnej marskości żółciowej i innych zaburzeń cholestatycznych. Lek ten jest dobrze tolerowany przez ciężarne. Mechanizm działania leku wydaje się polegać na wypieraniu hydrofobowych endogennych soli kwasów żółciowych z całej puli, chroniąc tym samym błonę komórek wątrobowych przed ich toksycznym działaniem. Wzmaga ponadto usuwanie kwasów żółciowych z organizmu płodu przez łożysko i chociaż nie wszyscy autorzy znajdują

uzasadnienie do stosowania UDCA w cholestazie ciężarnych, badania z wielu innych ośrodków pozwalają uznać kwas ursodeoksycholowy za lek z wyboru w farmakoterapii ICP.

We wstępie doktorantka bardzo szczegółowo przedstawia i opisuje klasyfikację, miejsca występowania oraz budowę dehydrogenazy alkoholowej i aldehydowej, które stanowią jej przedmiot zainteresowania w niniejszej pracy. Wspomina również o funkcjach jakie pełnią w/w enzymy oraz odnosi to do ich znaczenia w diagnostyce chorób wątroby. Wstęp zaopatrzony jest tabelą, która umożliwia czytelnikowi usystematyzowanie bardzo dużej ilości informacji zawartych tekście. Następnie autorka opisuje epidemiologię, etiopatogenezę oraz sposoby diagnostyki laboratoryjnej wewnątrzwątrobowej cholestazy ciężarnych. Doktorantka swobodnie porusza się w temacie pracy, potwierdzając swoje dobre teoretyczne przygotowanie. Poprawnie i wnikliwie uzasadnia wybór analizowanych czynników, jakiego to wyboru dokonała przystępując do badań.

Załączona bibliografia (oprócz piśmiennictwa wykorzystanego i zamieszczonego w dołączonych publikacjach) to 39 pozycji w 2/3 angielskojęzycznych, które zostały w pełni wykorzystane i prawidłowo cytowane. Niestety tylko 12 z nich pochodzi z ostatniego 10-lecia. Doktorantka dobrze potrafi poruszać się w cytowanym piśmiennictwie i wyszukuje przydatne w pracy naukowej informacje i doniesienia innych autorów.

Celem pracy było określenie profilu izoenzymów ADH i aktywności ALDH w surowicy pacjentek z ICP i ocena przydatności diagnostycznej badanych izoenzymów w rozpoznawaniu wewnątrzwątrobowej cholestazy ciężarnych.

Cele szczegółowe pracy zostały przedstawione krótko, ale bardzo precyzyjnie. Są nimi:

1. Oznaczenie aktywności dehydrogenazy alkoholowej i jej izoenzymów oraz dehydrogenazy aldehydowej w surowicy ciężarnych, u których wystąpiła cholestaza wewnątrzwątrobową, a następnie porównanie ich z grupą kontrolną składającą się ze zdrowych kobiet ciężarnych i nieciężarnych.
2. Porównanie uzyskanych aktywności analizowanych enzymów ze stężeniem klasycznego markera wewnątrzwątrobowej cholestazy ciężarnych, tj. całkowitych kwasów żółciowych, a także aktywnością enzymatycznych markerów ICP – AST, ALT, ALP, GGTP.

Wybór obydwóch celów badawczych w oparciu o przedstawione dane uważam za uzasadniony.

Próbę badawczą stanowiło 80 kobiet w ciąży (zakres wieku 19-40 lat), u których rozpoznano wewnątrzwątrobową cholestazę ciężarnych w II lub III trymestrze ciąży hospitalizowanych w II Klinice Położnictwa i Ginekologii Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego na podstawie badań klinicznych i laboratoryjnych (całkowite stężenie kwasów żółciowych, aktywność transaminaz). Badaną grupę porównywano z 80 zdrowymi kobietami w ciąży (w wieku 19-39 lat) w drugim lub trzecim trymestrze ciąży oraz z 40 zdrowymi kobietami niebędącymi w ciąży (w wieku 20-42 lata).

Bardzo precyzyjnie określono kryteria włączenia i wykluczenia do grupy badanej i kontrolnej. Szczegółowo została również przedstawiona metodologia prowadzonych badań. Charakterystyka pacjentek została przedstawiona w pracach oryginalnych. Projekt został zaakceptowany przez Komisję Bioetyczną (Nr R-I-002/434/2017) Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku.

Zarówno zakres badań jak i przedstawioną szczegółowo metodologię ich wykonania uważam za prawidłowe i wskazują one na duże zaangażowanie badawcze doktorantki.

Aby zobiektywizować wyniki badań, doktorantka poddała je analizie statystycznej stosując odpowiednie metody, na właściwym poziomie istotności. Dobór metod statystycznych uważam za prawidłowy, odpowiedni do zakresu przeprowadzonych badań.

Autorka z przeprowadzonych przez siebie badań wysunęła 3 trafne wnioski odpowiadające celom badań. Uważam, że doktorantka w pełni zrealizowała założone cele badawcze. Wnioski wysunięte są prawidłowo, zgodnie z zastosowaną metodologią badań. Cele pracy uważam za zrealizowane.

Dyskusja prowadzona jest w sposób usystematyzowany i analityczny, niemniej stanowi ona dla mnie najsłabszy aspekt recenzowanej pracy. Zbyt dużą część dyskusji stanowi powtórne omówienie etiologii, patogenezы cholestazy ciężarnych oraz wyników badań, o których była mowa już wcześniej. Autorka wspomina, że dotychczas eksplorowano różne markery pod kątem rozpoznania ICP, nie opisano jednak do tej pory znaczenia diagnostycznego dehydrogenazy alkoholowej i jej izoenzymów. Wspomina jedynie o nowej grupie potencjalnych markerów – sfingolipidach, jednak badania Mikuckiej i wsp. (jak zauważa sama autorka) nie sugerują, że mogą one zastąpić oraz mają przewagę nad rolą oznaczania kwasów żółciowych w diagnostyce ICP. Doktorantka na koniec dyskusji słusznie konstatuje, zgodnie z resztą ze szczegółowo omówioną przez siebie przydatnością diagnostyczną dehydrogenazy alkoholowej, iż jej aktywność całkowita oraz izoformy I w

diagnostyce cholestazy ciężarnych jest zbliżona do stosowanych dotychczas oznaczeń kwasów żółciowych oraz aminotransferaz alaninowych i asparaginianowych. Brak mi w tej części pracy krytycznej analizy, dlaczego warto w takim razie w dalszym ciągu przeprowadzać badania w kontekście ADH, a nie pozostać przy oznaczaniu kwasów żółciowych czy aminotransferaz. Za duży plus poczytuję sobie natomiast, bardzo udaną próbę, wyjaśnienia na poziomie patofizjologicznym otrzymanych rezultatów, zwłaszcza w artykule opublikowanym w czasopiśmie *Anitcancer Research*. *Summa summarum*, dyskusja podobnie jak poprzednie części pracy jest poprawna i godna uwagi. Autorka sama zauważyła ograniczenia swoich wyników, co świadczy o wysokim poziomie jej wiedzy oraz kompetencji.

Rolą recenzenta, obok odnalezienia pozytywów jest również poszukiwanie niedociągnięć w pracy doktorskiej. Po bardzo dokładnej analizie mam liczne zastrzeżenia co do semantyki oraz gramatyki w przedłożonej mi do oceny dysertacji. Już na 6 stronie pracy w podpunkcie „Wykaz skrótów” zauważyłem dwa błędy w tłumaczeniu. Zespół HELLP przetłumaczony jako „niskie płytki” oraz /UA jako „tętnica środkowa” uważam za niepotrzebnie obniżające jakość pracy. Na stronie 7 występuje błąd, gdyż klasa III ADH jest kodowana przez *Loci* genowe *ADH-5* (jak napisano słusznie w tabeli), a nie *ADH-4*, jak napisano w tekście. O licznych błędach interpunkcyjnych oraz gramatycznych w pracy nie wspominam, mając na względzie, że nie jest to praca z kręgu nauk humanistycznych. Uwaga ta, niech pozostanie wystarczająca. Przeglądową publikację w *Journal of Medicine* uważam za bardzo wartościową, podobnie jak dwie pozostałe prace autorskie.

Po zapoznaniu się i wnikliwej analizie pracy lek. Joanny Piechoty stwierdzam, że spełnia ona warunki określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. nr 65, poz. 595 z późn.zm.) i tym samym jest podstawą do ubiegania się o stopień naukowy doktora nauk medycznych, dlatego zwracam się do Wysokiej Rady Kolegium Nauk Farmaceutycznych Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku o dopuszczenie lek. Joanny Piechoty do dalszych etapów przewodu doktorskiego

Prof. dr hab. n. med. Rafał Stojko