



Łódź, 21 maja 2021r.

dr hab. n. med. Ewa Jabłońska, prof. IMP
Zakład Badań Translacyjnych
Instytut Medycyny Pracy im. prof. J. Nofera w Łodzi
ul. Św. Teresy 8, 91-348 Łódź
tel. 42 6314 785
e-mail: ewa.jablonska@imp.lodz.pl

**Ocena rozprawy doktorskiej mgr inż. Moniki Oldakowskiej pt.
„Analiza związku pomiędzy stężeniem Cu, Zn a polimorfizmem genów izoform
metalotioneiny oraz dysmutazy ponadtlenkowej u osób zdrowych oraz pacjentów z ostrym
stanem zapalnym trzustki”**

Promotor rozprawy: Prof. dr hab. Halina Milnerowicz

Promotor pomocniczy: Dr Milena Ściskalska

Celem przedstawionej mi do recenzji rozprawy była analiza związku pomiędzy stężeniem miedzi (Cu) i cynku (Zn) a polimorfizmem genów kodujących izoformy metalotioneiny (MT) oraz dysmutazę ponadtlenkową (SOD) w ostrym zapaleniu trzustki (OZT). Wymieniona jednostka chorobowa związana jest ze stanem zapalnym narządu, któremu towarzyszy wzrost aktywności lipazy i amylazy we krwi i moczu. Najczęstszą przyczyną choroby jest kamica żółciowa oraz nadużywanie alkoholu. Dokładny mechanizm powstawania stanu zapalnego w trzustce nie został poznany. Istotne znaczenie w patologii choroby przypisuje się zjawisku stresu oksydacyjnego, wynikającego z zaburzenia pomiędzy procesami pro- i antyoksydacyjnymi. Należy podkreślić, iż częstość występowania OZT zależy od regionu geograficznego, a dane epidemiologiczne wskazują, iż Polska należy do krajów o bardzo wysokim współczynniku zachorowalności na tę chorobę.

Z uwagi na powyższe, **temat niniejszej rozprawy doktorskiej uważam za uzasadniony i ważny** w zakresie badań nad uwarunkowaniami genetycznymi o potencjalnym znaczeniu w etiologii i przebiegu ostrego zapalenia trzustki. Wybór genów do badań, tj. genów kodujących izoformy metalotioneiny oraz dysmutazę ponadtlenkową, wydaje się **właściwy**, z uwagi na udział obu białek w obronie antyoksydacyjnej oraz ich interakcje bądź zależności z badanymi metalami.

Rozprawa liczy 247 stron, w tym 58 tabel, 5 rycin, 11 wykresów oraz 214 pozycji piśmiennictwa. Układ pracy jest typowy dla rozprawy naukowej, z podziałem na osiem rozdziałów (wstęp, cel pracy, materiał i metody, wyniki, dyskusję, wnioski, streszczenie w języku polskim i angielskim oraz piśmiennictwo), poprzedzonych spisem treści oraz wykazem skrótów. Na końcu rozprawy zamieszczono spis tabel, rysunków i wykresów oraz trzy załączniki (formularz ankiety dla osób badanych, kryteria kwalifikujące pacjentów z OZT do udziału w badaniach, oraz, charakterystykę osób badanych pod kątem markerów biochemicznych analizowanych we krwi). Zamieszczono również wykaz publikacji





naukowych, których Doktorantka jest współautorem. Warto podkreślić, iż jedna z wymienionych prac, opublikowana w czasopiśmie *Antioxidants* (IF = 5,014; 100 pkt MNiSW), dotyczy wyników Rozprawy. Jest to praca, w której mgr inż. Monika Ołdakowska jest drugim autorem. W wykazie znalazły się również dwa doniesienia ze zjazdów krajowych, na których Doktorantka prezentowała wyniki badań związanych z polimorfizmem metalotioneiny.

Wstęp pracy został podzielony na pięć podrozdziałów. W pierwszym z nich Doktorantka omówiła przyczyny wystąpienia ostrego stanu zapalnego trzustki oraz zmiany na poziomie narządowym, komórkowym oraz molekularnym obserwowane w przebiegu choroby. W dalszej kolejności omówiony został udział mikroelementów w rozwoju stresu oksydacyjnego w trzustce. W tej części, obok Zn i Cu, został opisany kadm (Cd; jako wyraźna część podrozdziału 1.2 zatytułowanego „Udział mikroelementów w rozwoju stresu oksydacyjnego w komórce trzustki”), co mylnie sugeruje, iż pierwiastek ten jest mikroelementem. Mikroelementy to pierwiastki niezbędne dla organizmu, (na które dobowe zapotrzebowanie dla człowieka wynosi poniżej 100 mg), natomiast Cd jest toksycznym metalem ciężkim, o udowodnionym działaniu rakotwórczym. Stąd nie można zaliczyć kadmu do mikroelementów. Dalsze podrozdziały dotyczą struktury i funkcji metalotioneiny oraz izoenzymów dysmutazy ponadtlenkowej, a także współdziałania obu enzymów w procesie neutralizacji wolnych rodników. W części tej został omówiony również związek polimorfizmu genetycznego metalotioneiny i dysmutazy ponadtlenkowej z patogenezą wybranych jednostek chorobowych. Doktorantka przybliżyła również znaczenie funkcjonalne wybranych wariantów polimorficznych.

We wstępie skupiono się zatem głównie na omówieniu zagadnienia stresu oksydacyjnego, z uwzględnieniem roli badanych w pracy pierwiastków (Zn, Cu) oraz białek i ich polimorficznych wariantów. Cennym urozmaiceniem tekstu jest przedstawiona na str. 23 rycina, dotycząca mechanizmów regulacji ekspresji genu *MT*. W mojej opinii, wstęp pracy stanowi wystarczające wprowadzenie do tematyki badawczej, chociaż w celu lepszego uporządkowania wiedzy, warto byłoby podać na samym początku definicję jednostki chorobowej, której dotyczy rozprawa, oraz przedstawić podstawowe dane epidemiologiczne jak współczynniki zachorowalności i umieralności w Polsce i na świecie. Zabrakło również definicji stresu oksydacyjnego.

Kolejny rozdział dotyczący **celu pracy**, zawiera krótkie wprowadzenie, będące uzasadnieniem wykonania szczegółowych analiz ilościowych w grupie osób zdrowych i pacjentów z OZT, z uwzględnieniem narażenia na dym tytoniowy jako istotnego czynnika o działaniu prooksydacyjnym. Doktorantka wskazuje następnie, iż z uwagi na brak danych dotyczących związku pomiędzy występowaniem wybranych polimorfizmów w genach kodujących *MT1A* (rs11640851), *MT1B* (rs964372), *MT2A* (rs10636) i *SOD1* (rs2070424) a stężeniem Zn i Cu u pacjentów z ostrym stanem zapalnym trzustki, w pracy „podjęto próbę oceny wpływu” ww. polimorfizmów na stężenie obu metali oraz na parametry równowagi pro/antyoksydacyjnej w środowisku wewnątrzkomórkowym (lizat erytrocytarny) i zewnątrzkomórkowym (osocze) w grupie pacjentów z ostrym stanem zapalnym trzustki i w grupie osób zdrowych. Można więc domyślać się, iż głównym celem pracy była (zgodnie z tytułem rozprawy) ocena wpływu polimorfizmu *MT* i *SOD1* na stężenie Zn i Cu oraz markery stresu oksydacyjnego w zapaleniu trzustki, a cel ten zrealizowano w oparciu o cele





szczegółowe, czyli analizy wymienione na stronie 35. Cel pracy został zatem sformułowany prawidłowo, ale powinien być wyraźnie wyodrębniony w tekście całego rozdziału, z podziałem na cel główny i cele szczegółowe. Taki układ rozdziału znacznie zwiększyłby jego czytelność.

W części pracy dotyczącej **materiału i metod badawczych** Doktorantka dokonała charakterystyki grupy badanej, która objęła łącznie 183 osoby, w tym 40 osób z OZT oraz dwie grupy porównawcze różniące się wiekiem (92 osoby w wieku 20-30 lat i 51 osób w wieku 30-70 lat). Co warto podkreślić, pacjenci byli rekrutowani do badania przez lekarzy klinicystów, na podstawie wywiadu oraz kryteriów diagnostycznych. Kryteria te zostały przedstawione szczegółowo w Załączniku 2. Czynnikiem wykluczającym z grupy badanej były choroby współistniejące o podłożu zapalnym, choroby wątroby, cukrzyca oraz choroby nowotworowe. W przypadku grupy kontrolnej natomiast, osoby były kwalifikowane do badania za pośrednictwem lekarzy podstawowej opieki zdrowotnej, ale Doktorantka nie wskazała szczegółowo kryteriów doboru grupy kontrolnej, podając jedynie informację, iż były to osoby „zdrowe”, nie przyjmujące suplementów diety i nienadużywające alkoholu. Obok informacji, iż materiał biologiczny od osób z grupy kontrolnej uzyskano z Polskiego Ośrodka Rozwoju Technologii (PORT) we Wrocławiu, należało podać, w jakich latach był zbierany i w jakiej populacji. Z punktu widzenia metodologii badań, istotna jest informacja, czy był to ten sam okres, w którym pozyskano dane i materiał od pacjentów, oraz czy wszystkie osoby reprezentowały tę samą populację (pochodziły z tego samego regionu Polski).

Charakterystyka grupy badanej pod kątem wieku, BMI i wartości stężenia białka hs-CRP w zależności od palenia oraz płci została przedstawiona w Tabelach 1 i 2, przy czym w tabelach nie wskazano czy różnice między podgrupami były istotne statystycznie. W Załączniku 3 przedstawiono bardziej szczegółową charakterystykę grup, zawierającą analizę statystyczną różnic i obejmującą markery biochemiczne stanu zapalnego, funkcji wątroby oraz gospodarki węglowodanowej i lipidowej, również w zależności od palenia i płci. W tym miejscu należy zwrócić uwagę na fakt, iż dane dotyczące białka hs-CRP przedstawione w Załączniku 3, zostały pokazane po raz drugi (wcześniej pokazano je w Tabelach 1 i 2 na str. 40 i 41). W mojej opinii, dane dotyczące hsp-CRP oraz IL-6 przedstawione w Załączniku 3, powinny stanowić część rozdziału Wyniki, ponieważ były przedmiotem badań i analiz. Ponadto, po dokładnym zapoznaniu się z Tabelą 1 z Załącznika 3, widać, iż wszystkie 3 grupy badane różniły się wyjściowo pod kątem rodzaju analizowanych markerów (na przykład aktywność enzymów wątrobowych była oznaczona tylko w grupie I i III, natomiast markery gospodarki węglowodanowej analizowano tylko w grupie II). Warto byłoby zatem wyjaśnić, dlaczego we wszystkich grupach nie były wykonane te same oznaczenia.

Obszerna część rozdziału Materiał i metody została poświęcona zastosowanym w pracy metodom badawczym. Bardzo dokładny opis wszystkich analiz, wraz z wykazem zastosowanych odczynników i aparatury oraz urządzeń laboratoryjnych, potwierdza znajomość i doświadczenie Doktorantki w zakresie metod immunoenzymatycznych, spektrofotometrycznych, turbidymetrycznych czy technik z zakresu biologii molekularnej. Wysokie współczynniki korelacji uzyskane dla roztworów standardowych (przedstawione na Wykresach 1-11) świadczą o rzetelności uzyskanych danych ilościowych.





W statystycznej analizie danych wykorzystane zostały testy parametryczne (test t-Studenta, ANOVA) i nieparametryczne (test U Manna-Whitneya, test Kruskala-Wallisa). W przypadku analizy wariancji, brakuje informacji czy i jakimi testami wykonano analizy post-hoc.

Część rozprawy prezentująca **wyniki** została podzielona na 4 podrozdziały, dotyczące kolejno analizy stężeń badanych markerów oraz ich związku z poszczególnymi wariantami polimorficznymi, z dalszym podziałem ze względu na płeć i palenie. Badane markery ilościowe objęły: stężenie cynku i miedzi w surowicy krwi, stężenie kadmu we krwi, stężenie kotyniny w surowicy, stężenie metalotioneiny oraz stężenie i aktywność izoenzymów dysmutazy ponadtlenkowej we krwi, a także stężenie malonyldialdehydu (MDA), białka hs-CRP, interleukiny 6 i ceruloplazminy w osoczu, oraz całkowitą pojemność antyoksydacyjną osocza. Dane zostały przedstawione w formie 54 tabel, z dołączoną analizą statystyczną różnic pomiędzy grupami, przy czym w przypadku większości markerów grupę pacjentów porównywano z grupą pacjentów w wieku 30-70 lat (w grupie pacjentów 20-30 lat analizowano jedynie różnice pod kątem stężenia metali). Z uwagi na bardzo dużą ilość prezentowanych danych, bardziej dogodną dla czytelnika formą przedstawienia wyników byłyby w mojej opinii wykresy.

Analiza wykazała, iż w porównaniu z osobami zdrowymi, u pacjentów z OZT zaobserwowano zaburzenia w stężeniu Zn i Cu oraz markerów procesów pro- i antyoksydacyjnych, z towarzyszącym podwyższeniem stężenia IL-6. Opisane zaburzenia wskazują na zjawisko stresu oksydacyjnego towarzyszące stanowi zapalnemu u chorych, mogące wynikać z zaburzonej homeostazy Zn i Cu. Istotne obserwacje dotyczyły stężenia Cd we krwi, potwierdzające jego związek z wiekiem i paleniem. Związek ten Doktorantka wykazała poprzez porównanie dwóch grup wiekowych. Szkoda, że nie zaprezentowano również współczynników korelacji pomiędzy wiekiem a stężeniem kadmu. W przypadku analizy pozostałych korelacji, opisane zostały jedynie istotne statystycznie zależności, które podsumowano w Tabeli 18.

Analiza danych w zależności od wariantów polimorficznych czterech genów (*MT1A*, *MT1B*, *MT2A*, *SOD1*) wykazała pojedyncze zależności na poziomie stężeń badanych metali oraz aktywności dysmutazy ponadtlenkowej i stężenia metalotioneiny w lizacie erytrocytarnym. W grupie pacjentów zaobserwowano związek głównie pomiędzy polimorfizmem *MT1A* i *MT2A* a stężeniem Zn we krwi, oraz pomiędzy polimorfizmem *MT2A* a stężeniem metalotioneiny w lizacie erytrocytarnym.

Część wynikowa rozprawy, została zakończona cennym dla czytelnika podsumowaniem najważniejszych obserwacji.

Dyskusja wyników objęła 14 stron rozprawy. Doktorantka omówiła uzyskane przez siebie wyniki, odnosząc się do nich w sposób uporządkowany i logiczny. Co najważniejsze, Autorka starała się łączyć ze sobą poszczególne obserwacje, szukając związku przyczynowo skutkowego pomiędzy zaburzeniami w stężeniach metali, poziomem badanych markerów antyoksydacyjnych a markerami stresu oksydacyjnego i procesów zapalnych. Dyskusję wzbogaciły głównie rozważania na temat funkcjonalnego znaczenia badanych wariantów polimorficznych w kontekście nasilenia procesów patologicznych w przebiegu choroby. Nie mam zastrzeżeń co do poziomu merytorycznego dyskusji, natomiast w tej części powinno znaleźć się również omówienie ograniczeń badania, jak chociażby mała liczebność grup (40





osób w grupie pacjentów w przypadku badania polimorfizmów stanowi duże ograniczenie w analizie danych). Warto byłoby również zastanowić się nad praktycznym wykorzystaniem uzyskanych wyników i odpowiedzieć na pytanie czy zaobserwowane zależności dotyczące polimorfizmu genetycznego metalotioneiny i dysmutazy ponadtlenkowej mogą mieć znaczenie kliniczne (na przykład rokownicze) w ostrym zapaleniu trzustki.

Uzyskane wyniki Doktorantka trafnie zinterpretowała, podsumowując je w postaci 11 **wniosek**. Dwa pierwsze wnioski (na temat kumulacji kadmu z wiekiem oraz spadku stężenia cynku na skutek narażenia na kadm u osób palących) powinny jednak być poparte odpowiednią analizą korelacji, a nie jedynie porównaniem międzygrupowym, o czym wspomniałam wcześniej.

Z wykazu **piśmiennictwa** wynika, iż Doktorantka wykazała się znajomością literatury i umiejętnością trafnego doboru artykułów naukowych, powołując się na prace publikowane w uznanych czasopismach międzynarodowych z listy Journal Citation Reports, stanowiące w około 30% prace opublikowane w ostatnich pięciu latach.

Z obowiązku recenzenta zwracam również uwagę na błędy i pomyłki o charakterze edytorskim lub technicznym, jak:

- zamienione osie na wykresie 6 (wartości absorbancji powinny być na osi rzędnych);
- zastosowanie w tabelach różnych jednostek dla hs-CRP ($\mu\text{g/mL}$, mg/dL lub mg/L), przy czym w Tabeli 3 Załącznika 3 nie wskazano żadnej jednostki;
- w części metodycznej, w opisie analizy stężenia ceruloplazminy, jako materiał badany wskazano surowicę (str. 60), ale pokazane w części wynikowej dane dotyczą osocza;
- w tytułach tabel 10, 12 i 13 powinna być informacja, której konkretnie grupy kontrolnej dotyczą dane (30-70 lat);
- brak jednolitego stylu w wykazie piśmiennictwa (zastosowano zarówno pełne jak i skrócone nazwy czasopism);
- brak nazwy czasopisma w wykazie publikacji naukowych na str. 247 (trzecia pozycja);
- nieliczne błędy stylistyczne i pomyłki językowe np. błony śluzowej zamiast „śluzówki” (str. 16), jedna a nie „jeden z najbardziej niebezpiecznych RFT” (str. 17), powtórzenia wyrazów („genów ze sobą ściśle powiązanych” na str. 21 czy „osób zdrowych” w tytułach Tabel 6-8); MT1B a nie „M1B” w tytule podrozdziału (str. 189); genotypu zamiast fenotypu (str. 83);
- str. 115: opisana jako dodatnia korelacja pomiędzy aktywnością Cu/Zn-SOD w osoczu a stężeniem MDA w Tabeli 18 jest ujemna ($r = -0,4157$);
- skrócone nazwy genów powinny być napisane kursywą
- część danych została zaprezentowana dwukrotnie. Dotyczy to markerów hs-CRP i IL-6, dla których dane pokazano zarówno w części wynikowej jak i w Załączniku 3. Ponadto, wartości białka hs-CRP pokazane są również (jak wspomniano wcześniej) w rozdziale dotyczącym metodyki, jako część charakterystyki grupy badanej. Należy zweryfikować poprawność niektórych wartości z uwagi na brak zgodności pomiędzy poszczególnymi tabelami;
- powielenie tych samych danych dotyczy w dalszej części Tabel 10-13, które powinny zostać połączone, ponieważ prezentują częściowo te same dane. Umieszczenie danych w postaci jednej tabeli zbiorczej znacznie ułatwiłoby interpretację danych oraz określenie wpływu palenia na badane zależności i różnice z wykorzystaniem analizy wariancji. Podobna uwaga dotyczy tabel 14-17, w których analizowano dane pod kątem podziału na płeć.





Ponadto, sugerowałabym unikać określeń „zaobserwowano wzrost czy spadek stężenia” w opisie różnic pomiędzy grupami ponieważ są to określenia używane w opisie dynamiki zmian w obrębie tej samej grupy badanej. W przypadku porównania różnych grup między sobą, odpowiednie jest określenie, iż wartości wybranych markerów były różne (wyższe/nizsze), tak jak prawidłowo opisała to Doktorantka w podsumowaniu wyników.

Powyższe uwagi techniczne i edytorskie nie mają wpływu na ogólną wartość naukową pracy, a wymienione wcześniej uwagi merytoryczne nie obniżają wartości poznawczej prezentowanych wyników. Należy oczekiwać, iż uzupełnienie dyskusji wyników jak również brakujące informacje w zakresie wprowadzenia do tematyki badawczej i metodologii badań, Doktorantka przedstawi w trakcie publicznej obrony.

Podsumowując, praca stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, a uzyskane wyniki są w moim przekonaniu bardzo cenne i podkreślają rolę cynku i miedzi oraz związanych z nimi białek w etiologii ostrego zapalenia trzustki. Praca wskazuje również na potencjalne znaczenie uwarunkowań genetycznych w rozwoju choroby. Na podstawie niniejszej rozprawy doktorskiej, stwierdzam, iż mgr inż. Monika Ołdakowska potrafi prawidłowo przeprowadzić badanie empiryczne i poprawnie zinterpretować jego wyniki. Na szczególne podkreślenie zasługuje ilość pracy włożonej w przeprowadzenie analiz będących przedmiotem badań, obejmujących zarówno czasochłonne oznaczenia laboratoryjne jak również analizę statystyczną uzyskanych wyników. Ponadto, rozprawa została napisana w sposób zrozumiały, z zachowaniem właściwej terminologii oraz z dbałością o poprawność językową. Pomimo przedstawionych uwag merytorycznych, **całokształt rozprawy oceniam pozytywnie** i jako świadczący o dojrzałości naukowej Doktorantki.

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska spełnia w mojej opinii warunki określone w artykule 13 ustawy z dnia 14 marca 2003r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki. Wniosuję do Rady Dyscypliny Nauki Farmaceutyczne Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu o dopuszczenie mgr inż. Moniki Ołdakowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

