



UNIwersYTET MEDYCZNY IM. KAROLA MARCINKOWSKIEGO W POZNANIU

ZAKŁAD ANATOMII PRAWIDŁOWEJ

ul. Święcickiego 6
60-781 Poznań

tel. 061 854 65 64
fax 061 854 65 68
e-mail: zap@ump.edu.pl

Poznań, 05 maja 2022 r.

Recenzja

rozprawy doktorskiej lek. med. Zbigniewa Krawczuka

**pt. „Ekspresja izoform metalotioneiny w hepatocytach w wirusowym zapaleniu wątroby
typu B oraz C”**

wykonanej w Katedrze Morfologii i Embriologii Człowieka,

Zakładzie Histologii i Embriologii

Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu

promotor: prof. dr hab. Piotr Dzięgiel

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska pt. „Ekspresja izoform metalotioneiny w hepatocytach w wirusowym zapaleniu wątroby typu B oraz C” lek. med. Zbigniewa Krawczuka podejmuje bardzo ciekawe i aktualne zagadnienie roli metalotioneiny w przebiegu wirusowego zapalenia wątroby typu B i C, które są najistotniejsze z uwagi na wysoką częstość zachorowań, jak i pojawiania się powikłań, tj. przewlekłe zapalenie wątroby, marskość czy rak wątrobowo-komórkowy. W pierwszym rozdziale Doktorant w sposób szczegółowy odniósł się do najnowszych danych epidemiologicznych oraz charakterystyki klinicznej osób zakażonych HBV. Szacuje się, że na całym świecie zakażenie HBV dotyka około 300 mln ludzi, co stanowi 4-5% całej populacji. Największą liczbę zakażeń odnotowuje się w Azji oraz regionie Pacyfiku. Dane epidemiologiczne wskazują, że w Chinach zakażonych jest blisko 10% społeczeństwa. Najczęstszą przyczyną zgonów pacjentów zakażonych HBV jest marskość wątroby oraz pierwotny rak wątroby. Śmiertelność spowodowana powikłaniami znacznie częściej dotyka mężczyzn niż kobiet (50% vs 15%). Najnowsze dane wskazują, że w Polsce na przewlekłe zapalenie wątroby typu B choruje blisko 400 tys. osób. W ostatnim podrozdziale dotyczącym WZW B zawarty jest szczegółowy opis terapii mającej na celu zahamowanie namnażania się wirusa. Powszechnie jest stosowanie leków tj. interferon czy inhibitory odwrotnej transkryptazy. Ponadto, Doktorant słusznie zwrócił uwagę również na konieczność utrzymania prawidłowego stanu nawodnienia

pacjenta, odżywienia, ograniczenia jego aktywności fizycznej, stosowania diety wątrobowej, jak i unikania leków, których biotransformacja zachodzi głównie w wątrobie.

W kolejnym rozdziale Doktorant niezwykle dokładnie przytoczył charakterystykę molekularną wirusa zapalenia wątroby typu C. Zwraca uwagę, że bardzo istotnym elementem warunkującym wysoką częstość zakażeń HCV są liczne mutacje wpływające na dużą zmienność genetyczną wirusa. Doktorant słusznie podkreśla, że skutkiem tak dużej zmienności oraz rearanżacji w obrębie genomu jest jego wysoka wirulencja, szybkość progresji choroby, ciężki przebieg powikłań, a co więcej, brak skutecznej szczepionki. Według szacunków Światowej Organizacji Zdrowia z 2015 roku, na świecie było około 71 mln ludzi zakażonych HCV. Doktorant bardzo wnikliwie przeanalizował dane epidemiologiczne przytaczając dokładne informacje odnoszące się do znacznego zróżnicowania geograficznego w stosunku do odnotowywanych zakażeń.

Przedstawiono również opis genów i kodowanych przez nie białek z rodziny metalotionein oraz ich rolę w przebiegu wirusowych zapaleń wątroby. W rozdziale tym Doktorant podkreśla, że pacjenci z genotypem interferonu lambda 3 charakteryzują się prawidłową odpowiedzią na leczenie interferonem oraz wyższą ekspresją metalotionein w hepatocytach. Ponadto poziom ekspresji metalotionein wykazuje korelację z niższymi wskaźnikami włóknienia wątroby.

Kolejny rozdział obejmuje cel badań, który został ujęty jako: badanie ekspresji mRNA izoform MT-I i MT-II w tkankach wątroby, analiza ekspresji przytoczonych powyżej białek w korelacji z parametrami klinicznymi pacjentów oraz określenie w jakim zakresie badane metalotioneiny mogą stanowić markery wykorzystywane w diagnostyce zapaleń wątroby typu B i C. W mojej ocenie Doktorant niezwykle trafnie określił cele badań postępując zgodnie z najwyższymi standardami metodologicznymi, rozpoczynając od analiz molekularnych, poprzez badania kliniczne, a kończąc na ocenie przydatności ekspresji metalotionein w diagnostyce różnicowej zapaleń wątroby typu B i C. Jediną moją uwagą jest dość niefortunne użycie słowa „wykazanie” w pierwszym celu, które jednoznacznie wskazuje, iż Doktorant „już wykazał” zależności, które były przedmiotem Jego badań. Sugeruję zamianę słowa na „analiza”, „ocena” czy „badanie”. Na uwagę zasługuje zastosowanie nietypowej formy wstępu przy przedstawieniu celów, który bardzo płynnie wprowadza czytelnika w główne założenia badań, stawiane pytania oraz weryfikowane hipotezy.

Po trafnie sformułowanych celach Doktorant scharakteryzował materiał badawczy oraz wykorzystane metody. W pierwszym paragrafie została dokładnie opisana grupa badana składająca się z 11 pacjentów zakażonych HBV oraz 18 pacjentów zakażonych HCV. Grupę

kontrolną stanowiło 9 pacjentów, u których nie stwierdzono w badaniu histologicznym zmian patologicznych w obrębie wątroby. W mojej ocenie tabela 8 opisująca dane kliniczne pacjentów w grupie kontrolnej oraz tabela 9 z opisem danych klinicznych w grupie badanej powinny być umieszczone na początku podrozdziału odnoszącego się do opisu materiału badawczego. W opisie grup pacjentów zabrakło informacji ile wśród nich stanowiły osoby płci męskiej oraz żeńskiej. Ponadto istotnym byłoby przedstawienie w formie tabeli charakterystyki klinicznej pacjentów, z uwzględnieniem wskaźników oraz parametrów diagnostycznych tj. wyniki badań krwi czy moczu. Uzupełnienie opisu grupy badanej o takie informacje znacznie wzbogaciłoby obraz kliniczny postaci choroby u pacjentów objętych badaniami. Na uwagę zasługuje bardzo szczegółowy opis oceny histopatologicznej oraz analiz immunohistochemicznych. Następnie Doktorant przedstawił procedurę izolacji całkowitego RNA, odwrotnej transkrypcji oraz qPCR, przedstawiając stężenia użytych odczynników w formie dwóch tabel. Analizę statystyczną Doktorant wykonał z wykorzystaniem kilku testów w zależności od tego czy uzyskane dane charakteryzowały się rozkładem parametrycznym lub nieparametrycznym. Doktorant dowiódł tym samym, że bardzo sprawnie posługuje się doбором właściwych testów statystycznych, co z uwagi na wielość analizowanych cech nie było łatwym zadaniem.

Opis wyników Doktorant rozpoczyna od przedstawienia przykładowego zdjęcia reakcji immunohistochemicznej opisującego ekspresję białka MT-I/II w hepatocytach prawidłowej wątroby w odniesieniu do hepatocytów pacjentów zakażonych HBV i HCV. Na uwagę zasługuje zestawienie ekspresji zarówno białka metalotioneiny, jak i izoform mRNA w formie dwóch przejrzystych tabel przedstawiających wartości (1) średniej, (2) mediany, (3) minimalnej i maksymalnej wartości ekspresji oraz (4) odchylenie standardowe. Doktorant w sposób bardzo przejrzysty, w formie wykresów, przedstawił różnice statystyczne w ekspresji białka oraz izoform genów kodujących metalotioneiny uwzględniając lokalizację jądrową i cytoplazmatyczną. Na drugim wykresie przedstawiono porównanie ekspresji pomiędzy grupą kontrolną a dwoma grupami badanymi, odpowiednio w grupie pacjentów zakażonych HBV oraz HCV. Warty podkreślenia jest, że Doktorant opisując wartości istotności statystycznych podaje test statystyczny, który wykorzystał do analizy wyników, co w znacznym stopniu ułatwia recenzentowi odniesienie się do prezentowanych danych. W opisach skrótów poszczególnych izoform metalotionein doszukałem się pewnej niekonsekwencji polegającej na tym, że w jednym przypadku Doktorant stosuje kursywę a w innych nie. Bardzo proszę o przesłanie sposobu przedstawiania skrótów przed przygotowaniem pracy do publikacji. Ponadto w paragrafie 5.5 Doktorant podaje ile osób

w grupie badanej i kontrolnej stanowiły kobiety i mężczyźni. Odnoszę się do mojej wcześniejszej sugestii, że taka informacja powinna być podana w paragrafie opisującym dobór pacjentów do badań. Rozdział wyniki zakończony jest dokładną analizą korelacji pomiędzy jądrową oraz cytoplazmatyczną ekspresją białka MT-I/II i ekspresją izoform genu kodującego metalotioneiny. Odnosząc się do analiz ekspresji izoform genu oraz białka doktorant posłużył się macierzami korelacji przyjmując bardzo wysokie poziomy istotności statystycznej. Tabela 13 przedstawia macierz korelacji pomiędzy ekspresją izoform genu oraz białka metalotioneiny w odniesieniu do parametrów laboratoryjnych w grupie pacjentów zakażonych HBV i HCV. Uważam, że przedstawienie wyników z podziałem na grupę mężczyzn i kobiet wzbogaciłoby obraz kliniczny pacjentów. Jest to jedynie moja sugestia, którą Doktorant może uwzględnić przygotowując publikację.

Kolejny rozdział stanowi dyskusja, w której doktorant odnosi się do: (1) danych epidemiologicznych zakażeń HBV i HCV na świecie, (2) roli metalotionein w patogenezie zakażeń HBV i HCV, przytaczając wyniki badań zarówno w modelach *in vitro*, jak i *in vivo*, (3) roli cynku w modulowaniu ekspresji metalotionein, (4) wpływu metalotionein na stres oksydacyjny i regulację apoptozy. W mojej ocenie jednym z istotniejszych wyników uzyskanych przez Doktoranta jest wykazanie, że zakażenie wirusami HBV i HCV zahamowuje mechanizmy ochronne komórek poprzez obniżenie ekspresji metalotioneiny. Doktorant szczegółowo opisał rolę metalotionein w regulacji stężenia wybranych parametrów biochemicznych, tj. stężenie bilirubiny, aktywność ALT i AST, fosfatazy alkalicznej oraz czynników krzepnięcia. W podsumowaniu dyskusji Doktorant bardzo obiektywnie, lub wręcz krytycznie, odniósł się do wyników uzyskanych przez siebie oraz innych autorów, mówiących o tym, że mechanizmy modulacji ekspresji metalotionein i ich rola w hamowaniu procesów patologicznych wywołanych zakażeniem HBV i HCV są niezwykle złożone.

Uzyskane wyniki Doktorant podsumował w trzech wnioskach sugerujących ważną rolę metalotionein w modulacji zmian patologicznych wywołanych zakażeniem HBV i HCV, podkreślając ochronny mechanizm podwyższonej ekspresji tych białek w hepatocytach pacjentów. Sugeruje także, że geny oraz białka metalotionein pod względem ich lokalizacji jądrowej i/lub cytoplazmatycznej nie powinny być wykorzystywane w diagnostyce różnicowej pacjentów zakażonych HBV i HCV.

W podsumowaniu, należy stwierdzić, iż Doktorant wykazał się dużą samodzielnością naukową i umiejętnością wyciągania z przeprowadzonych analiz poprawnych wniosków. Pragnę również podkreślić, że praca doktorska charakteryzuje się trafnością wyboru tematu. Doświadczenia zostały poprawnie zaplanowane i wykonane. Chciałbym zwrócić uwagę na

spójny dobór zastosowanych metod badawczych. Wykorzystana przez Doktoranta metodologia jest bardzo złożona, ponieważ obejmuje nie tylko analizy histologiczne czy molekularne, ale również liczne i ważne z punktu widzenia klinicznego, badania parametrów diagnostycznych. Na uwagę zasługuje również systematyczny i konsekwentny sposób przedstawiania wyników, który dowodzi dużej znajomości przez Doktoranta tematu podjętych badań. Ponadto uzyskane wyniki przyczyniają się do lepszego poznania omawianej tematyki. Dlatego też, praca doktorska stanowi cenne uzupełnienie dostępnego piśmiennictwa naukowego, stanowiąc zarazem podstawę do kontynuowania badań w tej tematyce.

Na zakończenie chciałbym podkreślić, że przedłożona mi do recenzji rozprawa doktorska została wykonana w jednym z najlepszych ośrodków w Polsce zajmujących się badaniami tkankowymi i komórkowymi. Tradycje wrocławskiego ośrodka histologicznego zostały ugruntowane dzięki prowadzeniu badań molekularnych, komórkowych oraz tkankowych na najwyższym poziomie, porównywalnym z placówkami nie tylko w Europie, ale i na świecie.

W mojej ocenie przedłożona do recenzji rozprawa doktorska lek. med. Zbigniewa Krawczuka spełnia warunki określone w art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595, z późn. zm). Zwracam się do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauki Medyczne Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu o dopuszczenie lek. med. Zbigniewa Krawczuka do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ponadto z pełnym przekonaniem mogę stwierdzić, że zarówno aktualna tematyka pracy doktorskiej, jak i całokształt prac badawczych wykonanych przez Doktoranta znacząco przekracza wymagania stawiane pracom doktorskim w zakresie nauk medycznych. Dlatego wnioskuję do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauki Medyczne Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu o przyznanie wyróżnienia rozprawy doktorskiej lek. med. Zbigniewa Krawczuka pt. „Ekspresja izoform metalotioneiny w hepatocytach w wirusowym zapaleniu wątroby typu B oraz C”.



prof. dr hab. n. med. Bartosz Kąmpisty