

Prof. dr hab. n. med. Danuta Kokocińska

Sosnowiec, 07.11.2024

Zakład Immunodiagnostyki Klinicznej

i Markerów Nowotworowych

WSS5 im. Św. Barbary

Plac Medyków 1

41-200 Sosnowiec

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr anal. med. Anny Sawko pt: „Aktywność egzoglikozydaz lizosomalnych w płynach ustrojowych denatów będących pod wpływem alkoholu” wykonanej pod kierunkiem prof. dr hab. n. med. i n. o zdr. Sławomira Dariusza Szajdy, w Katedrze Ratownictwa Medycznego Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie.

Niemal każdego dnia środki masowego przekazu informują o zabójstwach, wypadkach ze skutkiem śmiertelnym lub ciężkim uszkodzeniem zdrowia, a także przemoc domowej spowodowanych nadużywaniem alkoholu. Alkoholizm jest też przyczyną śmierci wielu pacjentów. Jak wykazują dane statystyczne przeciętny Polak wypija około 10l czystego alkoholu w ciągu roku. Niestety problem dotyczy również nieletnich dzieci i kobiet w ciąży.

Pijacy nie zdają sobie sprawy z oddziaływania alkoholu na organizm, szczególnie narażona jest wątroba i OUN. W metabolizmie alkoholu uczestniczy szereg enzymów. Autorka rozprawy podjęła się oceny aktywności wybranych egzoglikozydaz w zebranych materiale klinicznym. Przybliżyła rutynową diagnostykę laboratoryjną choroby alkoholowej, zwraca uwagę na nowe wskaźniki, do których należą egzoglikozydazy lizosomalne.

Rozprawa ma klasyczny układ, liczy 98 stron, zawiera Wstęp, Cel pracy, Materiał i Metodyka, Wyniki oraz Omówienie i Dyskusję oraz Piśmiennictwo. Ponadto rozprawa zawiera wykaz skrótów, spis rycin i tabel, oraz streszczenie w j. polskim i angielskim.

We Wstępie A. Sawko przybliżyła dane epidemiologiczne i statystyczne spożycia alkoholu, porównuje je na tle Europy. Szczegółowo omawia negatywny wpływ alkoholu etylowego na organizm człowieka, dużo miejsca poświęca metabolizmowi etanolu oraz udziału wielu enzymów w powyższym procesie.

Ciekawie i b.dokładnie omawia wybrane egzoglikozydazy. Wstęp napisany jest ciekawie i świadczy o dobrej orientacji Doktorantki w przedstawionych zagadnieniach. Za cel rozprawy doktorskiej mgr A. Sawko postawiła przebadanie aktywności egzoglikozydaz lizosomalnych we krwi, moczu i cieple szklistym oka oraz płynie rdzeniowo-mózgowym osób, które zmarły z powodu alkoholizmu i zmarłych nagle, ale nie będących po spożyciu alkoholu.

Cele szczegółowe to:

1. Ocena katabolizmu glikokoniugatów u osób zmarłych będących pod wpływem alkoholu.
2. Ocena możliwości oznaczenia aktywności egzoglikozydaz lizosomalnych: HEX, jej izoenzymów HEX A i HEX B, GAL, FUC, MAN, GLU w surowicy krwi, moczu, cieple szklistym oka, płynie mózgowo – rdzeniowym pobranych od osób zmarłych.
3. Ocena zmian w aktywności egzoglikozydaz lizosomalnych: HEX, jej izoenzymów HEX A i HEX B, GAL, FUC, MAN, GLU w surowicy krwi, moczu, cieple szklistym oka, płynie mózgowo – rdzeniowym osób zmarłych z powodu zatrucia alkoholem etylowym.
4. Kontrola jakości prowadzonych badań na podstawie obliczeń: czułości oraz swoistości testu.
5. Ocena możliwości zastosowania oznaczeń aktywności egzoglikozydaz lizosomalnych w diagnostyce obecności alkoholu etylowego u osób zmarłych.

Badaniu poddano 52 nieżyjących pacjentów – 10 kobiet i 42 mężczyzn w wieku od 15-82 lat. Materiał badawczy stanowiły krew, mocz, ciało szkliste i płyn rdzeniowo-mózgowy.

Badanych podzielono na 2 grupy. Grupę kontrolną stanowiło 30 nieżyjących osób – 22 mężczyzn i 8 kobiet, którzy nie chorowali na chorobę alkoholową, trzeźwych w momencie zgonu, u których w płynach ustrojowych nie stwierdzono obecności etanolu.

Grupę badawczą natomiast stanowiło 22 zmarłych chorych, w tym 20 mężczyzn i 2 kobiety, u których wykryto w płynach ustrojowych, wysokie powyżej 4 g/dm³ etanolu. Przyczyną zgonu tych osób był wypadek samochodowy, samobójstwo lub inne zdarzenia.

Krew, mocz, ciało szkliste i płyn rdzeniowo-mózgowy pobierano od wszystkich badanych podczas sekcji zwłok, do 12h od momentu stwierdzenia zgonu. Krew, mocz, ciało szkliste i płyn rdzeniowo-mózgowy wirowano przez 20 min przy 4000 obrotów na minutę, w temp. +4°C, a następnie podzielono do probówek i przechowywano w temp. -80°C.

We wszystkich próbkach oznaczono aktywność egzoglikozydaz lizosomalnych: N-acetylo-β-D heksozaminazy (HEX) i jej izoenzymów A i B, α-mannozydazy (MAN), α-fukozydazy (FUC) i β-galaktozydazy (GAL) metodą Chatteerjee w podwójnych próbach w modyfikacji Zwierza i Marciniak zaadoptowaną do oznaczeń na mikroplątkach.

Aktywność β-glukuronidazy (GLU) oznaczono metodą Marciniak i współpracowników, ponadto określono stężenie białka całkowitego oraz etanolu. Stężenie etanolu oznaczono metodą chromatografii gazowej.

Wszystkie uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej. Zastosowano test ANOVA rang Kruskala-Wallisa z testem post-hoc. W obliczeniach wykorzystano pakiet Statistica 13.3 firmy TIBCO. Wyniki badań przedstawiono w 6 tabelach oraz graficznie na 21 rycinach.

Autorka rozprawy wykazała wyższą aktywność HEX i jej izoenzymów A i B, MAN, FUC, GAL oraz GLU w moczu osób z grupy kontrolnej w porównaniu do grupy badanej tj. osób zmarłych z powodu zatrucia etanolem.

Stwierdziła statystycznie wyższe stężenie aktywności MAN i GAL w cieple szklistym grupy kontrolnej w porównaniu do zmarłych po zatruciu etanolem.

Wykazała brak istotnych różnic stężenia aktywności HEX, izoenzymów A i B, MAN, FUC, GLU w płynie rdzeniowo-mózgowym badanych grup.

Autorka rozprawy stwierdziła ponadto brak istotnych statystycznie różnic aktywności specyficznej (pKat/ μ g białka) w moczu chorych badanych grup. Natomiast w cieple szklistym badanych, aktywność specyficzna MAN była istotnie statystycznie wyższa w grupie kontrolnej w porównaniu do zmarłych po zatruciu alkoholem, pozostałe egzoglikozydazy lizosomalne takich statystycznych różnic w badanych grupach nie wykazały.

Podobnie w moczu badanych chorych nie stwierdzono znamienności statystycznej aktywności specyficznej ocenianych egzoglikozydaz lizosomalnych.

Reasumując, Autorka rozprawy stwierdza, stężenie aktywności HEX, HEXA i HEXB oraz MAN i GAL jest znamienne wyższe w surowicy krwi osób zatrutych alkoholem w porównaniu do grupy kontrolnej, natomiast aktywność FUC i GLU była wyższa w grupie kontrolnej. Podobnie stężenie aktywności HEX, HEXB, HEXA, MAN, FUC, GAL i GLU było zdecydowanie wyższe również w grupie kontrolnej, podobną zależność obserwuje się w płynie mózgowo-rdzeniowym. Autorka stwierdziła, że aktywność HEXB w płynie mózgowo-rdzeniowym była wyższa u osób u których śmierć nastąpiła z powodu zatrucia alkoholem.

Aktywność HEXA, MAN, FUC, GAL i GLU była natomiast wyższa w cieple szklistym oka w grupie kontrolnej, w porównaniu do grupy zmarłych z powodu alkoholu.

Ocena aktywności specyficznej egzoglikozydaz lizosomalnych HEX, HEXB, MAN, FUC i GAL jest większa u osób z grupy kontrolnej, dla HEXA zależność jest dokładnie odwrotna, zaś aktywność specyficzna GLU jest identyczna w obydwu grupach. Mgr A. Sawko oceniła też przydatność oznaczeń wykreślając krzywe ROC. Najwyższą czułość 76% uzyskano dla HEXA w moczu, dla osób zmarłych z powodu alkoholu, największą swoistość wykazuje MAN (100%) i GAL (96%). Oceniono także współczynnik korelacji pomiędzy badanymi parametrami diagnostycznymi i badanymi grupami.

Ciekawy rozdział stanowi Dyskusja. Mgr Anna Sawko porównuje uzyskane własne wyniki z wynikami innych badaczy. Z dużą dojrzałością omawia wyniki własnych badań, szeroko uzasadnia różnice.

Autorka wykazała też możliwość wykorzystania w diagnostyce laboratoryjnej wybranych egzoglikozydaz lizosomalnych, należących do hydrolaz lizosomalnych.

W ciekawy sposób przybliży związek glikokoniugatów z cyklem komórkowym, w procesach różnicowania, proliferacji i wzrostu komórki oraz w przekazywaniu sygnałów między komórkami. Dyskusja własnych wyników na tle innych autorów, wyjaśnianie mechanizmu uszkodzeń tkanek i narządów prowadzone są dojrzałe, z dużą wiedzą i na wysokim poziomie.

Pracę kończy 5 wniosków:

1. Alkohol etylowy wpływa na katabolizm glikokoniugatów po śmierci.

2. Możliwe jest oznaczenie aktywności egzoglikozydaz lizosomalnych w surowicy krwi, moczu, cieple szklistym oka i płynie mózgowo – rdzeniowym osób zmarłych.
3. Oznaczenie stężenia aktywności N-acetylo- β -D-heksozoaminidazy, jej izoenzymy B i A, α -mannozydazy, α -fukozydazy, β -galaktozydazy i β -glukuronidazy w moczu, α -mannozydazy i β -galaktozydazy w cieple szklistym oka oraz aktywności specyficzne α -mannozydazy w cieple szklistym oka może różnicować osoby zmarłe po spożyciu alkoholu od innych zmarłych.
4. Oznaczenie stężenia aktywności i aktywności specyficzne egzoglikozydaz lizosomalnych w surowicy krwi, moczu, cieple szklistym oka oraz płynie mózgowo – rdzeniowym może mieć zastosowanie w diagnostyce spożycia alkoholu u osób zmarłych.
5. Konieczne są dalsze badania nad przydatnością oznaczenia aktywności egzoglikozydaz lizosomalnych w diagnozowaniu przyczyny śmierci u osób po spożyciu alkoholu etylowego.

Piśmiennictwo zawiera 140 pozycji, głównie polsko- i anglojęzycznych, dobrze dobrane, nowoczesne, głównie opublikowane po 2010 r.

Po przeczytaniu rozprawy nasunęły mi się drobne uwagi, które z obowiązku Recenzenta zacytuję:

- Proponuję, aby wedle przyjętych zasad, stosować formę bezosobową np. zaplanowano, oznaczono itd. a nie zaplanowałam, oznaczyłam.

- Do błędów redakcyjnych zaliczam fakt, że nie powinno rozpoczynać zdania od Dlatego-to jest spójnik poprzedzony przecinkiem

- W rozprawie przedstawiono wiele badanych egzoglikozydaz, statystyki opisowe: średnie, mediany, odchylenia standardowe, korelacje. Ogrom danych utrudnia zrozumienie wyników badań, dla przygotowania publikacji proponuję przedstawić wyniki, dla których wykazano znamienność statystyczną i wysoką korelację a dla pozostałych zaznaczyć, że nie wykazują znamienności statystycznych, co ułatwi zrozumienie pracy.

- Proponuje przereklamować wniosek 1 i 3 z :

1. Alkohol etylowy wpływa na katabolizm glikokoniugatów po śmierci, ale czyjej? na: Alkohol etylowy wpływa na katabolizm glikokoniugatów u denatów.

3. Oznaczenie stężenia aktywności N-acetylo- β -D-heksozoaminidazy, jej izoenzymy B i A, α -mannozydazy, α -fukozydazy, β -galaktozydazy i β -glukuronidazy w moczu, α -mannozydazy i β -galaktozydazy w cieple szklistym oka oraz aktywności specyficzne α -mannozydazy w cieple szklistym oka może różnicować osoby zmarłe po spożyciu alkoholu od innych zmarłych - na: Oznaczenie stężenia aktywności N-acetylo- β -D-heksozoaminidazy, jej izoenzymy B i A, α -mannozydazy, α -fukozydazy, β -galaktozydazy i β -glukuronidazy w moczu, α -mannozydazy i β -galaktozydazy w cieple szklistym oka oraz aktywności specyficzne α -mannozydazy w cieple szklistym oka może różnicować osoby zmarłe po spożyciu alkoholu od innych przyczyn zgonu.

Powyższe uwagi nie mają wpływu na wartość pracy, którą oceniam wysoko.

Mgr Anna Sawko podjęła próbę oceny wybranych egzogikozydaz lizosomalnych w płynach ustrojowych denatów będących pod wpływem alkoholu. Realizacja celów rozprawy wymagała bardzo dużego wkładu pracy doktorantki, poczynając od pozyskania materiału badawczego od 52 denatów, przez żmudne, liczne oznaczenia analityczne, aż po złożoną ocenę statystyczną. Właśnie opracowanie statystyczne rozprawy stanowi jej mocną stronę. Ocenę uzyskanych wyników i wyciągnięcie wniosków wymagało dużej wiedzy i dojrzałości Doktorantki.

Należy podkreślić, że rozprawa ma nie tylko aspekt naukowo-badawczy, ale dotyczy istotnego problemu społecznego, jakim są nadużywanie i uzależnienie od alkoholu, ze wszystkimi negatywnymi konsekwencjami. Należy podkreślić, że wyniki badań mgr Sawko, którymi wykazała przydatność oznaczeń enzymów lizosomalnych mają wartość praktyczną, dla lekarzy POZ we wczesnym wykrywaniu uzależnienia od alkoholu i możliwości podjęcia leczenia, jak również dla ustalenia przyczyn zgonu w Zakładach Medycyny Sądowej.

W podsumowaniu stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa spełnia wszystkie wymogi stawiane osobom ubiegającym się o stopień naukowy doktora, dlatego proszę Wysoki Senat Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku o dopuszczenie mgr analityki medycznej Anny Sawko do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

D. Kokocińska