



UNIWERSYTET
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

Recenzja rozprawy doktorskiej na stopień doktora nauk medycznych

przygotowanej przez Panią mgr anal. med. Annę Sawko

pod tytułem

„Aktywność egzoglikozydaz lizosomalnych w płynach ustrojowych
denatów będących pod wpływem alkoholu”

Informacje wstępne i ocena formalna

Przedstawiona do oceny dysertacja Pani mgr Anny Sawko została wykonana pod kierunkiem Pana prof. dr hab. Sławomira Dariusza Szajdy w Katedrze Ratownictwa Medycznego Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie. Została ona przygotowana w postaci klasycznej monografii naukowej i zajmuje 98 stron, a jej tematyka badań stanowi od lat jeden z głównych przedmiotów zainteresowań naukowych Promotora niniejszej rozprawy doktorskiej.

Rozprawa doktorska poprzedzona jest wprowadzeniem obejmującym następujące rozdziały: *Wstęp, Metabolizm alkoholu, Alkoholizm, Glikokoniugaty, Egzoglikozydazy lizosomalne, Diagnostyka laboratoryjna choroby alkoholowej* – łącznie 27 stron, w którym omówione zostały zagadnienia dotyczące alkoholizmu, dostępnych metod diagnostyki laboratoryjnej choroby alkoholowej oraz wpływu alkoholu na aktywność egzoglikozydaz lizosomalnych. Ta część dysertacji pozwala na jasne i precyzyjne sformułowanie celów badawczych, które ostatecznie miały dać odpowiedź na pytanie czy możliwa jest diagnostyka obecności etanolu u osób zmarłych na podstawie oznaczeń aktywności wybranych egzoglikozydaz lizosomalnych w czterech płynach ustrojowych. Pięć celów badawczych realizowanych zostało w oparciu o metodykę badań opisaną na ośmiu stronach. Uzyskane wyniki zostały udokumentowane na dwunastu rycinach i w czterech tabelach. Rozprawę doktorską zamyka ośmio-stronnicowa dyskusja, pięć wniosków oraz bibliografia obejmująca 140 pozycji literaturowych. Zgodnie z wymogami formalnymi dysertacja zawiera streszczenia w języku polskim i angielskim – łącznie 11 stron. Taki układ rozprawy doktorskiej nie odbiega od ogólnie przyjętego i spełnia wymogi formalne stawiane tego typu opracowaniom.

Ocena merytoryczna

W 27-stronnicowym wprowadzeniu obejmującym rozdziały 1-6 rozprawy doktorskiej, Doktorantka skupiła się na przedstawieniu problemów zdrowotnych, skutków społecznych i wiktymogennych związanych z nadmiernym spożywaniem alkoholu etylowego, sprecyzowała czym cechuje się uzależnienie od alkoholu, co dane epidemiologiczne mówią na temat konsumpcji alkoholu w Unii Europejskiej, jak wygląda wielkość i struktura spożycia napojów alkoholowych w Polsce oraz jaka jest skala zjawiska picia alkoholu przez osoby niepełnoletnie. Ponadto Doktorantka szczegółowo opisała

Wydział Biologii

Instytut Zoologii

i Badań Biomedycznych

Zakład Biochemii

Glikokoniugatów

ul. Gronostajowa 9

30-387 Kraków

tel.: 12 664 64 62

fax: 12 664 51 01

<http://www.uj.edu.pl/web/instytut-zoologii/jednostka/struktura/zaklad-biochemii-glikokoniugatow>



UNIwersytet
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

metabolizm alkoholu etylowego zachodzący w wątrobie z udziałem dehydrogenazy alkoholowej i dehydrogenazy aldehydowej, oraz mikrosomalny układ utleniania etanolu będący równoległym szlakiem przemian alkoholu, który odgrywa szczególnie istotną rolę w sytuacji gdy organizm przyjmuje większe dawki alkoholu i częściej niż sporadycznie, oraz niekorzystny wpływ alkoholu etylowego na strukturę i funkcje dwóch organów, to jest wątroby i mózgu. Dodatkowo wspomniane zostały aktualnie stosowane biochemiczne markery choroby alkoholowej bazujące na poziomie aktywności γ -glutamylotransferazy (GGTP), aminotransferaz asparaginowej (AST) i alaninowej (ALT), średniej objętości krwinek czerwonych (MCV) oraz teście CDT (z ang. Carbohydrate Deficient Transferrin). Z uwagi na potencjalną możliwość wykorzystywania innych enzymów w diagnostyce, przedstawione zostały również informacje dotyczące budowy i funkcji pięciu egzoglikozydaz lizosomalnych, to jest N-acetylo- β -D-heksozoaminidazy (HEX), β -galaktozydazy (GAL), α -mannozydazy (MAN), α -fukozydazy (FUC) i β -glukuronidazy (GLU) oraz zmian w ich aktywności stwierdzanych w różnych stanach patologicznych. Substratami wspomnianych enzymów są różne typy glikokoniugatów, dlatego Doktorantka skrótkowo opisała ich główne typy oraz katabolizm glikokoniugatów. Ta część rozprawy doktorskiej powstała w oparciu o 107 pozycji literaturowych.

Ta część dysertacji została zilustrowana dziewięcioma rycinami prezentującymi schemat metabolizmu etanolu przy udziale enzymów wątrobowych i mikrosomalnego układu utlenienia alkoholi, a ponadto graficzną prezentacją danych dotyczących konsumpcji alkoholu w krajach Unii Europejskiej w 2019 roku oraz wielkość i strukturę spożycia napojów alkoholowych w Polsce. Natomiast dwie tabele pokazują jak zmienia się aktywność pięciu egzoglikozydaz lizosomalnych w wybranych jednostkach chorobowych. Moim zdaniem dobrze byłoby jeszcze dodać przynajmniej dwie ryciny. Pierwszą przedstawiającą typy glikokoniugatów występujących u ssaków, a drugą pokazującą które wiązania glikozydowe ulegają hydrolizie w glikokoniugatach na skutek katalitycznej aktywności HEX, GAL, MAN, FUC i GLU. Byłoby to bardzo pomocne dla czytelników, którzy nie mają dużej wiedzy z zakresu glikobiologii.

Po lekturze tej części rozprawy doktorskiej mogę stwierdzić, że Doktorantce są dobrze znane zagadnienia opisywane w tej części dysertacji i potrafi ona swobodnie poruszać się w ich zakresie. Wprowadzenie do dysertacji zostało napisane w sposób przemyślany, a zdefiniowanie zauważonych braków (zakresu niewiedzy), których przeprowadzone do tej pory badania nie objęły w sposób wystarczający, dało merytoryczne podstawy do zaplanowania badań i podjęcia próby oryginalnego rozwiązania tego problemu naukowego. Ten zakres niewiedzy to brak informacji czy egzoglikozydazy lizosomalne mogłyby stać się czułymi i swoistymi markerami diagnostycznymi retrospektywnego spożycia alkoholu etylowego i ustalenia trzeźwości pacjenta w chwili zgonu w diagnostyce sądowej.

Uważam jednak, że problematyka dotycząca wyników odnoszących się do poziomu aktywności pięciu egzoglikozydaz lizosomalnych u osób

Wydział Biologii

Instytut Zoologii

i Badań Biomedycznych

Zakład Biochemii

Glikokoniugatów

ul. Gronostajowa 9

30-387 Kraków

tel.: 12 664 64 62

fax: 12 664 51 01

<http://www.uj.edu.pl/web/instytut-zoologii/jednostka/struktura/zaklad-biochemii-glikokoniugatow>

nadużywających alkoholu etylowego czy zmarłych z powodu zatrucia alkoholem etylowym wspomniana w ostatnim akapicie Rozdziału 6. *Diagnostyka laboratoryjna choroby alkoholowej*, a uzyskanych dzięki wieloletnim badaniom naukowców z Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku, zasługuje na dokładniejsze przedstawienie w tym miejscu lub zasygnalizowanie, że problematyka ta zostanie szerzej opisana w rozdziale *Dyskusja*. Ponadto, moim zdaniem Rozdział 4. *Glikokoniugaty* i Rozdział 5. *Egzoglikozydazy lizosomalne* lepiej było umieścić po Rozdziale 6., w którym była mowa o egzoglikozydazach lizosomalnych w kontekście ich potencjału diagnostycznego w chorobie alkoholowej.

Na podstawie pomiaru aktywności pięciu egzoglikozydaz lizosomalnych w surowicy krwi, moczu ciele szklistym oraz płynie mózgowo-rdzeniowym osób zmarłych będących pod wpływem alkoholu (stężenie etanolu we krwi ≥ 4 g/L), Doktorantka miała na celu (cytuję):

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

Grupę kontrolną w niniejszych badaniach stanowiły trzeźwe osoby, które zmarły nagle z różnych przyczyn, u których wykluczono obecność chorób nowotworowych, wątroby, nerek, przewlekłych stanów zapalnych oraz reumatoidalnego zapalenia stawów. Na przeprowadzenie badań opisanych w niniejszej rozprawie doktorskiej uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku, świadomą zgodę prawnie upoważnionych przedstawicieli lub opiekunów osoby zmarłej, a wszystkie procedury wg deklaracji Doktorantki zostały przeprowadzone zgodnie z obowiązującymi wytycznymi i przepisami. Sposób przygotowania materiału biologicznego do badań (krwi, moczu, ciała szklistego i płynu mózgowo-rdzeniowego) został przedstawiony, tak samo jak skrócona charakterystyka grupy badanej i grupy kontrolnej.

Metodyka badań obejmowała oznaczanie aktywności HEX oraz oddzielnie dwóch jej izomerów A i B, FUC, GAL i MAN zgodnie z procedurą opisaną w pozycjach literaturowych 108-110, a GLU zgodnie z procedurą



UNIWERSYTET
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

Wydział Biologii

Instytut Zoologii

i Badań Biomedycznych

Zakład Biochemii

Glikokoniugatów

ul. Gronostajowa 9

30-387 Kraków

tel.: 12 664 64 62

fax: 12 664 51 01

<http://www.uj.edu.pl/web/instytut-zoologii/jednostka/struktura/zaklad-biochemii-glikokoniugatow>



UNIwersytet
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

opisaną w pozycji literaturowej 110. Dodatkowo oznaczane było stężenie alkoholu etylowego metodą chromatografii gazowej z wykorzystaniem tzw. techniki headspace (HS-GC-FID) na podstawie ilości aldehydu octowego, będącego metabolitem etanolu zgodnie z procedurą opisaną w pozycji literaturowej 22, oraz stężenie całkowitego białka metodą fotometryczną z wykorzystaniem czerwieni pirogalonowej zgodnie z procedurą opisaną w pozycji literaturowej 103. Firmy, w których zakupiono odczynniki wykorzystywane w poszczególnych oznaczeniach zostały przez Doktorantkę wymienione.

Moim zdaniem zostały wybrane adekwatne metody do realizacji założonych celów badawczych. Aby możliwe było powtórzenie niniejszych badań bez odwoływania się do odpowiednich publikacji, należałoby w Rozdziale 8.2 *Metody* uściślić następujące kwestie:

1. Jaki był skład jakościowy i ilościowy 0,1 M buforu fosforanowo-cytrynianowego, 100 mM buforu octanowego o pH 4,5 oraz 200 mM buforu boranowego o pH 9,8?
2. Czy używano 0,1 M buforów fosforanowo-cytrynianowych o dwóch różnych pH, to jest o pH 4,7 dla oznaczania aktywności HEX i jej izomerów A i B, oraz o pH 4,3 dla oznaczania aktywności MAN, FUC i GAL? Zwrot „jak wyżej” na str. 38 sugeruje coś innego.
3. Czy faktycznie do zatrzymania reakcji podczas oznaczania aktywności HEX używano 0,2 M buforu boranowego (str. 36)?
4. W porównaniu do opisu oznaczania aktywności enzymów lizosomalnych, opis oznaczania stężenia białka całkowitego i stężenia etanolu (na podstawie aldehydu octowego) jest zbyt lakoniczny. Pożądane byłoby bardziej szczegółowe opisanie tych procedur.

Wyniki uzyskane na podstawie przeprowadzonych procedur, poddano analizie statystycznej. Najpierw sprawdzono normalność rozkładu analizowanych zmiennych ilościowych, a następnie porównano zmienne ilościowe testami jednoczynnikowej analizy wariancji dla rang Kruskala-Wallisa oraz kolejności par Wilcoxon. Ostatecznie wyznaczono współczynnik korelacji porządku rang Spearmana. Do wyboru testów i przeprowadzonej analizy statystycznej nie mam zastrzeżeń.

Przeprowadzona analiza statystyczna wykazała, że pomiędzy grupą badaną A i grupę kontrolną (K), których liczebność wynosiła odpowiednio $n=22$ i $n=30$, nie stwierdzono różnic ze względu na wiek, a analogiczna analiza ze względu na płeć nie była możliwa z uwagi na zbyt małą liczbę kobiet, to jest ośmiu w kontrolnej i dwóch w badanej. Wyniki dotyczące aktywności enzymatycznej i aktywności właściwej badanych enzymów w surowicy udokumentowano w postaci wykresów pudełkowych i tabel. Doktorantka wykazała, że aktywność enzymatyczna HEX, obu jej izozymów, FUC, GAL, GLU i MAN w moczu osób zmarłych z powodu zatrucia alkoholem była istotnie statystycznie niższa w porównaniu do grupy kontrolnej, a spadki te były w zakresie 2-5-krotnym. W ciele szklistym analogiczny istotny statystycznie

Wydział Biologii

Instytut Zoologii

i Badań Biomedycznych

Zakład Biochemii

Glikokoniugatów

ul. Gronostajowa 9

30-387 Kraków

tel.: 12 664 64 62

fax: 12 664 51 01

<http://www.uj.edu.pl/web/instytut-zoologii/jednostka/struktura/zaklad-biochemii-glikokoniugatow>



UNIwersytet
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

spadek aktywności enzymatycznej jedynie dla MAN. W pozostałych płynach – krwi i płynie mózgowo rdzeniowym – nie stwierdzono żadnych istotnych statystycznie różnic pomiędzy obiema grupami (A i K). Jeśli chodzi o aktywność właściwą, to jedyną statystycznie istotną różnicę wykazano w przypadku spadku tej wartości dla MAN w cieple szklistym. W grupie A w sposób istotny statystycznie spada również stężenie białka całkowitego w porównaniu z grupą K. Ponadto Doktorantka wykazała, że występują zależności pomiędzy badanymi egzoglikozydazami w obrębie badanej próby w grupach badanych, czułość i swoistość oznaczania aktywności enzymatycznej egzoglikozydaz lizosomalnych HEX, obu jej izozymów, FUC, GAL, GLU i MAN w moczu i cieple szklistym oraz aktywności właściwej MAN w cieple szklistym dla grupy A jest zróżnicowana. W mojej opinii analiza i interpretacja uzyskanych wyników została przeprowadzona w sposób prawidłowy.

Do tej części dysertacji mam następujące pytania i komentarz:

1. Z jakiego powodu liczebność (n) grup A i K nie jest zawsze taka sama dla czterech badanych płynów (surowica krwi, mocz, ciało szkliste, płyn mózgowo-rdzeniowy)? Nie znalazłam w rozprawie doktorskiej żadnej wzmianki tego dotyczącej.
2. Jakie były wartości aktywności właściwej poszczególnych egzoglikozydaz lizosomalnych we krwi? Brakuje odpowiedniej ryciny albo przynajmniej komentarza wyjaśniającego ten fakt. To samo dotyczy wyników odnoszących się do stężenia białka całkowitego we krwi.
3. Ryciny 11- w części A zawierają po siedem wykresów pudełkowych, co powoduje, że trudno jest taki zestaw zmieścić na jednej stronie formatu A4. Czy nie byłoby dobrym rozwiązaniem przy przygotowaniu tych wyników do publikacji zmodyfikować sposób prezentacji wyników, to jest na jednej rycinie zamieszczać wyniki dotyczące wartości aktywności enzymatycznej (lub aktywności właściwej) dla danego enzymu w czterech płynach ustrojowych, a nie jak do tej pory – wartości odpowiednich parametrów dla wszystkich egzoglikozydaz w danym płynie ustrojowym.

Dysertację kończy ciekawie poprowadzona dyskusja, w której Doktorantka omawia istotność uzyskanych przez siebie wyników na tle dostępnej, niezbyt licznej, literatury przedmiotowej. Dodatkowo zwraca w niej uwagę na ograniczenia występujące przy ustalaniu trzeźwości u osób zmarłych czy oceny fazy metabolizmu alkoholu, w związku z zachodzącymi pośmiertnymi procesami. Doktorantka ma świadomość, że uzyskane przez nią wyniki, chociaż są obiecujące jeśli chodzi o możliwość wykorzystania parametru aktywności egzoglikozydaz lizosomalnych w moczu i cieple szklistym w diagnostyce osób zmarłych z powodu zatrucia alkoholem, to wymagają potwierdzenie w badaniach obejmujących większą grupę osób. Pięć ostatecznie sformułowanych wniosków końcowych jest odpowiedzią na postawione cele i ma pokrycie w uzyskanych wynikach. Oba streszczenia pokazują treść całej

Wydział Biologii

Instytut Zoologii

i Badań Biomedycznych

Zakład Biochemii

Glikokoniugatów

ul. Gronostajowa 9

30-387 Kraków

tel.: 12 664 64 62

fax: 12 664 51 01

<http://www.uj.edu.pl/web/instytut-zoologii/jednostka/struktura/zaklad-biochemii-glikokoniugatow>

rozprawy doktorskiej, tzn. zawierają wszystkie jej elementy – wstęp, cele, materiały i metody, wyniki i wnioski końcowe. Całą dysertację dobrze się czyta, jest ona zaplanowana logicznie, więc łatwo podążać za tokiem myślenia Doktorantki.



UNIwersytet
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

Uwagi dotyczące strony edycyjnej rozprawy doktorskiej

Z obowiązku recenzenta przedstawiam również uwagi dotyczące strony edycyjnej rozprawy doktorskiej.

1. W spisie treści nie pojawia się informacja, że został sporządzony *Wykaz skrótów* (str. 5-6).
2. Mam uwagi lub zastrzeżenia do następujących skrótów zamieszczonych w *Wykazie skrótów*:
 - DNA – obecnie to kwas deoksyrybonukleinowy, dawniej używano nazwy kwas dezoksyrybonukleinowy (str. 5),
 - CDT – bardziej prawidłowa byłoby nazwa „ubogowęglowodanowa forma transferryny” (jak na str. 32), co byłoby zgodne z terminologią pochodzącą z języka angielskiego *Carbohydrate Deficient Transferrin*, chociaż *de facto* dotyczy to desjalowanej transferryny (str. 5),
 - GluNAc – to skrót dla N-acetyloglukozoaminy, a nie N-acetyloglikozaminy (str. 6),
 - w piśmiennictwie biochemicznym funkcjonują dwa skróty dla dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego (NAD⁺ oraz NADH), dzięki czemu możliwe jest rozróżnienie czy chodzi o jego formę utlenioną czy zredukowaną; taka dodatkowa informacja powinna być też zamieszczona na str. 6,
 - GGT – nieprawidłowy skrót dla γ -glutamylotransferazy; na stronie 18 wprowadzony został skrót GGTP.
3. Na str. 12 i 13 pojawia się nieprawidłowy skrót NAD zamiast NAD⁺.
4. W Tabeli 1 dla N-acetylo- β -D-heksozaminidazy używany był skrót hex zamiast HEX wprowadzonego na str. 26.
5. Zgodnie z przyjętą konwencją nazwy tacińskie bakterii wymienionych na str. 28 i 29 powinny być pisane kursywą.
6. W Rozdziale 4.1 zamiast „rozpad” wiązań glikozydowych powinno być „hydroliza”.
7. Jeśli chodzi o poprawność formalno-językową, stylistyczną i ortograficzną, to zauważyłam błędy (wielokrotnie brak spacji – „przyklejanie” jednostek do wartości liczbowych, niepotrzebne spacje, przestawione litery w wyrazach, błędy w deklinacji, „zgubione” litery w wyrazach, brak indeksów dolnych w pisowni H₂O i K₂B₄O₇ – str. 36).
8. Zwykle tak formatuje się tekst, że główne rozdziały, czyli Rozdział 1, Rozdział 2, i itd., rozpoczynają się od nowej strony.

Wydział Biologii

Instytut Zoologii

i Badań Biomedycznych

Zakład Biochemii

Glikokoniugatów

ul. Gronostajowa 9

30-387 Kraków

tel.: 12 664 64 62

fax: 12 664 51 01

<http://www.uj.edu.pl/web/instytut-zoologii/jednostka/struktura/zaklad-biochemii-glikokoniugatow>

Uwagi końcowe

Na podstawie przedstawionego powyżej podsumowania jednoznacznie stwierdzam, że badania opisane w niniejszej rozprawie doktorskiej stanowią oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, a moje krytyczne uwagi głównie o charakterze redakcyjnym, nie umniejszają wysokiej oceny wartości merytorycznej rozprawy doktorskiej Pani mgr anal. med. Anny Sawko. Doktorantka wykazała, że potrafi samodzielnie prowadzić badania i zrealizować postawione cele badawcze, a także przeprowadzić ich dogłębną analizę.

Uważam, że przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr anal. med. Anny Sawko pod tytułem „*Aktywność egzoglikozydaz lizosomalnych w płynach ustrojowych denatów będących pod wpływem alkoholu*” w pełni spełnia warunki określone w artykule 187 ust. 1-4 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 roku Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2023 poz. 742 z późn. zmianami). W związku z powyższym, wnoszę do Senatu Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku o dopuszczenie Pani mgr. anal. med. Anny Sawko do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne.

dr hab. Małgorzata Przybyło, prof. UJ

Kraków, 14.11.2024 r.



UNIwersytet
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

Wydział Biologii

Instytut Zoologii

i Badań Biomedycznych

Zakład Biochemii

Glikokoniugatów

ul. Gronostajowa 9

30-387 Kraków

tel.: 12 664 64 62

fax: 12 664 51 01

<http://www.uj.edu.pl/web/instytut-zoologii/jednostka/struktura/zaklad-biochemii-glikokoniugatow>