



Białystok, 21.10.2025 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej
lek. Krzysztofa Hadriana

pt. „Charakterystyka biochemiczna mysiego modelu choroby Wilsona”

Promotor: prof. dr hab. n. med. i n. o zdr. Adam Przybyłkowski

Klinika Gastroenterologii i Chorób Wewnętrznych
Warszawski Uniwersytet Medyczny

Wprowadzenie do recenzji

Chociaż choroba Wilsona (ChW) jest schorzeniem rzadkim, to niespecyficzne objawy wielonarządowe przyczyniają się do opóźnienia lub braku prawidłowego rozpoznania, a nieleczona prowadzi do śmierci pacjenta. ChW jest dziedziczną autosomalnie recesywnie chorobą, w której na skutek mutacji genu *ATP7B* dochodzi do zaburzenia wydalenia miedzi do żółci. Konsekwencją tego jest nadmierne gromadzenie się pierwiastka w wątrobie, a następnie innych narządach. Akumulacja miedzi w wątrobie prowadzi do jej postępującego uszkodzenia, włóknienia i rozwoju marskości wątroby. Wraz z postępem choroby dochodzi do odkładania się miedzi mózgu, oku, sercu, nerkach powodując zaburzenia wieloukładowe, m.in. manifestacje neurologiczne lub psychiatryczne. ChW może prowadzić do wystąpienia ostrej niewydolności wątroby wymagającej pilnego przeszczepienia narządu. Świadomość występowania choroby oraz zastosowanie dostępnych metod diagnostycznych pozwala na ustalenie rozpoznania zanim rozwiną się zagrażające życiu powikłania ze strony wątroby i objawy neurologiczne. Terapia, która składa się z fazy indukcyjnej i podtrzymującej, ma na celu eliminację objawów i niewydolności narządowej oraz poprawę jakości życia.

Zainteresowanie badaczy ChW zaowocowało opracowaniem licznych modeli zwierzęcych z mutacjami genów homologicznych do ludzkiego genu *ATP7B*. Na szczególną uwagę zasługuje szczep myszy *Jackson toxic milk* (txJ), u których przebieg naturalny choroby naśladuje ChW u ludzi. Opracowany model pozwala na wnikliwą analizę patomechanizmów prowadzących do rozwoju i progresji schorzenia na poziomie nauk podstawowych. Uzyskane w ten sposób dane mogą pomóc opracowaniu skuteczniejszych metod diagnostyki i leczenia. W obliczu powyższych informacji rozprawa doktorska lekarza Krzysztofa Hadriana dotyczy tematu niezmiennie istotnego nie tylko pod względem badania naukowego, ale również w wymiarze codziennej praktyki klinicznej.

Omówienie rozprawy

Przedstawiona do oceny dysertacja sporządzona jest w sposób poprawny, typowy dla rozpraw doktorskich. Praca liczy łącznie 117 stron, zawiera 34 tabele, 32 wykresy i 3 ryciny ilustrujące

uzyskane wyniki.

Problem badawczy został przedstawiony na 26 stronach podzielonych na 4 rozdziały. W pierwszym z nich zatytułowanym „Kliniczna manifestacja ChW” Doktorant z widoczną znajomością tematu opisał zagadnienia związane z patogenezą choroby, z uwzględnieniem zaburzonej funkcji białka ATP7B oraz przedstawił przebieg kliniczny choroby. Niezwykle szczegółowo scharakteryzowano spektrum objawów wątrobowych, neurologicznych, psychiatrycznych, nefrologicznych oraz manifestacji kardiologicznych, okulistycznych i hematologicznych występujących w ChW. W kolejnym rozdziale omówiono dostępne metody diagnostyczne z analizą ich zalet oraz ograniczeń poszczególnych metod. Przedstawiono skalę Lipską będącą narzędziem diagnostycznym pozwalającym na skonsolidowanie wyników badań i ocenę prawdopodobieństwa występowania ChW. W rozdziale dotyczącym terapii Doktorant szczegółowo opisał dostępne formy leczenia choroby, ich skuteczność, działania niepożądane oraz możliwość stosowania u pacjentek w ciąży. Bardzo interesującym elementem tej części dysertacji jest fragment dotyczący prób zastosowania terapii genowej w ChW oraz podkreślenie konieczności restrykcji dietetycznych z zastosowaniem pokarmów ubogich w miedź. W części dotyczącej modeli zwierzęcych ChW omówiono dostępne modele szczurze, mysie i innych kręgowców posiadające mutacje genów homologicznych do ludzkiego *ATP7B*. Scharakteryzowano nieprawidłowości dotyczące wątroby i mózgu u myszy szczepu *Jackson toxic milk* (txJ), które były wykorzystane w rozprawie doktorskiej. Podsumowując, Wstęp dysertacji został przygotowany bardzo dobrze i stanowi właściwe wprowadzenie do planowanych badań.

Celem projektu badawczego, którego efektem jest rozprawa doktorska, była analiza zmian biochemicznych oraz ocena wpływu płci na przebieg choroby u myszy txJ.

W badaniu wykorzystano 61 myszy szczepu txJ natomiast, grupę kontrolną utworzono z 81 myszy szczepu C3HeB/FeJ podzielonych na 4 grupy wiekowe, przy założeniu stosunku płci 1 : 1. Liczebność i podział grup wiekowych zostały dobrane na podstawie spodziewanych wyników projektu i dotychczasowych doświadczeń zespołu z wykorzystaniem tego modelu mysiego. Po osiągnięciu zamierzonego punktu kontrolnego pobierano krew, mózg, wątrobę, serce, gałkę oczną lewą, dwunastnicę do dalszych oznaczeń. Pomiar stężenia pierwiastków przeprowadzono metodą całkowitego odbicia promieniowania rentgenowskiego, natomiast skład biochemiczny mózgu i wątroby oceniono metodą Fourierowskiej spektroskopii w podczerwieni, mierzącej charakterystyczne dla danej cząsteczki widmo absorpcji. Przeprowadzono ponadto mapowanie przekrojów czołowych OUN u 2- i 14-miesięcznych myszy w celu porównania map rozkładu istotnych pierwiastków z mapami składu chemicznego. Sposób wykonania pomiarów i interpretacja uzyskanych wyników zostały bardzo dokładnie przedstawione przez Doktoranta. Badania biochemiczne krwi obejmowały oceną aktywności ceruloplazminy, AST, ALT, ALP, stężenia bilirubiny, albuminy, neurofilamentów. Na przeprowadzenie projektu uzyskano zgodę I Lokalnej Komisji Etycznej do spraw doświadczeń na zwierzętach w Warszawie. Metodyka przeprowadzonych badań nie budzi zastrzeżeń recenzenta.

Uzyskane wyniki zostały przedstawione niezwykle szczegółowo w postaci opisowej oraz licznych rycin, tabel, jak również map rozkładu przestrzennego pierwiastków i białek w OUN. Świadczy to o niezwyklej staranności Doktoranta w opracowaniu danych, jak również jego dojrzałości naukowej przy ich interpretacji. U myszy txJ w porównaniu do zwierząt kontrolnych wykazano m.in. podwyższone stężenia Cu we wszystkich badanych narządach, czemu towarzyszyły zmiany stężenia wapnia. Podczas gdy ilość miedzi w wątrobie i dwunastnicy była większa już u dwumiesięcznych myszy txJ, w porównaniu do kontroli, zawartość miedzi w mózgu, sercu czy oku u txJ była istotnie wyższa dopiero u zwierząt ośmiomiesięcznych. Jak słusznie zauważa Doktorant

taki obraz może być związany z naturalnym przebiegiem choroby. Stwierdzono ponadto zmiany stężenia lipidów i zaburzenia struktury drugorzędowej białek w wątrobie u tych zwierząt. Podwyższone stężenie neurofilamentów w surowicy 4-miesięcznych txJ, współwystępowało z uchwytynymi zmianami składu biochemicznego wątroby i wyprzedzało wystąpienie zaburzeń składu pierwiastkowego i biochemicznego wątroby. Przebieg choroby u samic txJ różnił się od tego obserwowanego u samców w zakresie wątrobowego stężenia miedzi, wapnia i cynku, stężenia miedzi i żelaza w wątrobie oraz niższego osocznego stężenia ceruloplazminy u samic. Korzystając z przywileju recenzenta pozwolę sobie na jedną uwagę. W mojej opinii bardzo przydatnym uzupełnieniem wyników byłoby uwzględnienie badania patomorfologicznego wątroby myszy txJ i kontrolnych w poszczególnych punktach czasowych. Pozwoliłoby to na potwierdzenie postępującego uszkodzenia narządu wraz z narastającymi zaburzeniami składu biochemicznego i pierwiastków u myszy txJ. Przedstawiona uwaga nie wpływa na wartość uzyskanych danych. Opracowane wyniki wskazują na umiejętności Doktoranta odnośnie prawidłowego przeprowadzenia samodzielnego zadania badawczego i właściwego zrealizowania tego projektu

Wielowątkowa dyskusja świadczy o ogromnej wiedzy Autora w badanym temacie. Doktorant nie tylko podsumowuje uzyskane przez siebie wyniki, ale dokonuje też ich interpretacji i porównania do dostępnych obserwacji zarówno u ludzi jak i w modelach zwierzęcych, tłumacząc jednocześnie ewentualne odmienności w otrzymanych danych. Przykładem jest analiza potencjalnych przyczyn zmniejszenia stężenia miedzi w wątrobie u starszych myszy txJ. Doktorant podkreśla nowatorskie wyniki uzyskane w badaniu, do których zaliczył: przedstawienie po raz pierwszy profilu stężenia wapnia w wątrobie i sercu, wpływu ChW na zmianę struktury drugorzędowej białek w wątrobie, ocena surowiczego stężenia albuminy, wykazanie degradacji białek OUN w populacji myszy txJ.

Zwieńczeniem pracy są wnioski, które stanowią podsumowanie najważniejszych wyników wraz z ich interpretacją. Co istotne, zawarte wnioski odpowiadają na postawione cele badawcze, choć w mojej opinii są za bardzo rozbudowane, zawierając we wniosku pierwszym i drugim powtórzenie wyników. Wybór literatury cytowanej w rozprawie jest bardzo dobry i świadczy o doskonałej znajomości piśmiennictwa w wybranym przez Autora temacie, jak również o jego trafnym wykorzystaniu.

Podsumowując, z uwagi na przedstawione powyżej zalety oraz niezwykle istotną tematykę pozwalającą na dalsze badania w zakresie diagnostyki i terapii ChW, przedstawioną do oceny rozprawę doktorską lekarza Krzysztofa Hadriana oceniam bardzo wysoko. Dysertacja jest niewątpliwym przykładem oryginalnego opracowania problemu klinicznego, świadczącego o wysokiej wiedzy naukowej Doktoranta.

Stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska stanowi oryginalne rozwiązanie istotnego problemu naukowego i spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2018 poz. 1668). W związku z powyższym mam zaszczyt przedstawić Radzie Dyscypliny Nauk Medycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego **wniosek o dopuszczenie lekarza Krzysztofa Hadriana do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

Prof. dr hab. n. med. Jarosław Daniluk

prof. dr hab. n. med. Jarosław Daniluk
specjalista chorób wewnętrznych
gastroenterolog
8710903

