

Dr hab. n. med. Dariusz Kajdaniuk
Zakład Patofizjologii
Katedra Patofizjologii i Endokrynologii
Wydział Lekarski z Oddziałem Lekarsko-Dentystycznym w Zabrze
Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

Zabrze, 7.08.2013 r.

Ocena

rozprawy doktorskiej mgr Agaty Sarniak
pt. Badanie wybuchu oddechowego i mitochondrialnej produkcji reaktywnych form tlenu
metodą chemiluminescencji

Rozprawa doktorska przedłożona przez mgr Agatę Sarniak pochodzi z Zakładu Fizjologii Ogólnej Katedry Fizjologii Doświadczalnej i Klinicznej Wydziału Nauk Biomedycznych i Kształcenia Podyplomowego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, placówki znanej i cenionej z powodu prowadzenia szeroko zakrojonych wielokierunkowych badań z zakresu fizjologii jak i patofizjologii, prowadzonych zarówno na materiale doświadczalnym jak i klinicznym.

Tematyka pracy jest aktualna i bardzo interesująca, skupia się bowiem na zagadnieniach związanych z działaniem reaktywnych form tlenu, które z jednej strony są toksycznymi produktami metabolizmu komórkowego, z drugiej zaś wykazano, że organizmy nie tylko przystosowały się do koegzystencji z tymi niebezpiecznymi cząsteczkami, ale wypracowały też mechanizmy umożliwiające pożyteczne wykorzystanie wolnych rodników jako biomolekuł biorących udział w regulacji funkcji komórkowych, co gwarantuje prawidłowy przebieg wielu procesów fizjologicznych. Dzięki układowi antyoksydacyjnemu utrzymywana jest homeostaza prooksydacyjno-antyoksydacyjna, a jej zachwianie na rzecz oksydantów nosi nazwę „stresu oksydacyjnego” - w którym dochodzi do szkodliwego oddziaływania reaktywnych form tlenu na lipidy, białka enzymatyczne i DNA. Nadmierna produkcja reaktywnych form tlenu ma znaczenie kliniczne – stanowi element patogenezy m.in. chorób układu sercowo-naczyniowego, niedokrwienych, nowotworowych, neurodegeneracyjnych jak choroba Alzheimera i Parkinsona, a przede wszystkim procesu starzenia się organizmu. Ocena intensywności syntezy reaktywnych form tlenu w różnych jednostkach chorobowych pozwala na poznanie ich patogenezy. W tym celu wykorzystuje się zjawisko chemiluminescencji, bowiem syntezie reaktywnych form tlenu towarzyszy emisja światła. Podjęcie przez Doktorantkę próby ustalenia optymalnych warunków dla testu chemiluminescencji krwi pełnej pozwalającego na monitorowanie produkcji reaktywnych form tlenu w trakcie wybuchu oddechowego fagocytów i przeprowadzenie w dalszym etapie rozbudowanej pracy doświadczalnej zasługuje więc na uznanie.

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska liczy 145 stron i została podzielona na klasyczne rozdziały stosowane w tego typu opracowaniach.

Poprzedza ją przejrzysty Spis Treści (3 strony) i wyczerpujące Wykazy Skrótów i Symboli (2 strony). W tej części zastosowanie FMLP zamiast fMLP jest w pierwszej chwili mylące.

We Wstępie liczącym 29 stron Doktorantka na podstawie aktualnego piśmiennictwa przedstawia różne aspekty działania reaktywnych form tlenu, wymienia najważniejsze z nich, omawia ich znaczenie, miejsca powstawania w organizmie, funkcje biologiczne. Tłumaczy czym jest „wybuch oddechowy fagocytów”, a także szczegółowo opisuje rolę oksydazy NADPH i mitochondrialną produkcję reaktywnych form tlenu w połączeniu z działaniem inhibitorów łańcucha oddechowego na ten proces. Ta część dysertacji ma walory bardzo precyzyjnej, a z uwagi na temat („stres oksydacyjny”) wartościowej pracy przeglądowej. Autorka używa określenia reaktywne formy tlenu i skrótu RFT, co jest jak najbardziej prawidłowe, choć ze względu na powszechne w piśmiennictwie stosowanie skrótu ROS (ang. *reactive oxygen species*) można go było przynajmniej raz przytoczyć tym bardziej, że w innych miejscach Wstępu rozwinięcia skrótów w języku angielskim (mniej znanych) są obecne (np. str 3). Nie znalazłem w tej części rozprawy pozycji piśmiennictwa 72. We Wstępie warto zwrócić uwagę na bardzo przejrzystą autorską Rycinę 4.

Uzasadnienie podjęcia badań, innymi słowy założenia pracy, prowadzą do sformułowania pięciu zasadniczych celów dysertacji: 1. Określenia optymalnych warunków testu chemiluminescencji krwi pełnej monitorującego produkcję RFT w trakcie wybuchu oddechowego. 2. Wykorzystania testu chemiluminescencji w celu monitorowania mitochondrialnej produkcji RFT. 3. Wykorzystania testu chemiluminescencji w celu monitorowania produkcji RFT w trakcie wybuchu oddechowego granulocytów. 4. Sprawdzenia czy granulocyty obojętnochłonne niezdolne do wybuchu oddechowego produkują RFT po zablokowaniu łańcucha oddechowego cyjankiem potasu. 5. Sprawdzenia czy wielokrotnej ekspozycji granulocytów na działanie cyjanku potasu towarzyszy wzrost chemiluminescencji i czy komórki te zdolne są do wybuchu oddechowego. W komentarzu do Założeń pracy zastanawiam się czy trochę niefortunne nie jest stwierdzenie, że „komórki fagocytujące wytwarzają w trakcie wybuchu oddechowego pewną ilość RFT, które pełnią rolę bakteriobójczą. Jednak nadmierna produkcja RFT prowadzi do stresu oksydacyjnego, który uważany jest za jeden z głównych czynników odpowiedzialnych za powstawanie wielu chorób i za proces starzenia organizmu”. Słowo „Jednak” sugeruje ewidentne połączenie tych często oddzielnie toczących się patomechanizmów chorobowych (tu: np. zakażenie bakteryjne vs. starzenie się organizmu). W mojej opinii w Celach pracy nie powinno się stosować skrótów nazw, jeśli nie są powszechnie stosowane w medycynie. Postawienie sobie celu optymalizacji testu chemiluminescencji oceniam bardzo wysoko – ten fakt jest dla mnie przesłanką, że Doktorantka bierze pod uwagę praktyczne zastosowanie metody w medycynie.

Wystarczający dla celów zamierzonej pracy materiał kliniczny obejmował 97 osób obojga płci (57 kobiet i 40 mężczyzn) w wieku 19-65 lat. Zastanawiałem się co oznacza +/- 9,9 (SD?). Podczas rekrutacji do badania zastosowano 3 zrozumiałe/oczywiste w tym przypadku kryteria wyłączenia.

Rozdział Metody (16 stron) jest dla mnie imponujący, a czytając go odniosłem wrażenie, że Doktorantka porusza się w tym zakresie bardzo swobodnie i samodzielnie co wynika zapewne z dużej wiedzy i umiejętności. Opis metodologii był dla mnie zrozumiały choć nie jestem biochemikiem i diagnostą laboratoryjnym. Oznaczeń dokonano z użyciem nie

budzących zastrzeżeń nowoczesnych technik analitycznych. Zgromadzony materiał opracowano statystycznie prawidłowo stosując testy odpowiednie do tego typu opracowań.

Rozdział Wyniki zawiera 34 czytelne ryciny i 18 czytelnych tabel. Rozdział ten jest bardzo bogato ilustrowany i precyzyjnie opisany - zawiera dużą ilość obserwacji biochemicznych i statystycznych oraz porównań, z których część wybiega poza założone cele pracy.

Dyskusja obejmuje 21 strony. Ułatwieniem w jej czytaniu byłoby przytaczanie w niektórych miejscach numerów rycin i tabel. Trzonem dyskusji jest wyczerpujący przegląd piśmiennictwa. Tak obszerna i rzeczowa dyskusja dowodzi szerokiej i rzetelnej wiedzy Doktorantki dotyczącej poruszanych zagadnień, umiejętności wykorzystania aktualnych danych z piśmiennictwa jak również umiejętności krytycznego rozpatrywania argumentów przemawiających za wnioskami. W Dyskusji odczułem pewien niedosyt związany z brakiem podjęcia przez Doktorantkę próby nawiązania, w oparciu o piśmiennictwo, do aspektu klinicznego np. do zastosowania własnych spostrzeżeń metodologicznych (i nie tylko) w poznaniu patogenezы niektórych jednostek chorobowych.

Proponowane wnioski w liczbie 8 znajdują oparcie w całości wywodów Doktorantki, aczkolwiek w większości mają raczej formę opisu uzyskanych wyników. Wniosek 1 jest jednoznaczny i bardzo praktyczny, nie powinien jednak mieć formy równoważnika zdania. Powinno raczej być: „Optymalnymi warunkami testu chemiluminescencji ... są: ...”. W mojej opinii we Wnioskach należy unikać stosowania skrótów nazw.

Piśmiennictwo w większości anglojęzyczne, nie pomijające jednak istotnych doniesień polskich składa się z 205 pozycji. Rozdział ten, należałoby poprawić pod względem edytorskim (przeciwnie do perfekcyjnie opracowanych w tym zakresie rozdziałów wcześniejszych). Dysertacja zawiera streszczenia w języku polskim (4 strony) i angielskim (4 strony).

Przechodząc do zbiorczej oceny rozprawy doktorskiej przedłożonej przez mgr Agatę Sarniak stwierdzić trzeba, że dysertacja ta dotyczy zagadnienia niezwykle aktualnego, ważnego i interesującego nie tylko ze względów poznawczych, lecz także - może nawet przede wszystkim - już wkrótce ze względów praktycznych, klinicznie użytecznych. Przeprowadzone badania przyniosły bardzo ważne informacje metodologiczne, pozwalające na standaryzację testu chemiluminescencji i przygotowania materiału biologicznego do badań wybuchu oddechowego i mitochondrialnej produkcji reaktywnych form tlenu. Oceniana rozprawa wskazuje na bardzo dobrą ogólną wiedzę teoretyczną na temat fizjologii i patofizjologii homeostazy prooksydacyjno-antyoksydacyjnej a także dowodzi umiejętności prowadzenia pracy badawczej w tym zakresie. Zebrany materiał jest wystarczający dla należytego udokumentowania wniosków a metodyka postępowania badawczego jest dobrana właściwie oraz precyzyjnie opisana. Całość przedstawionych powyżej uwag nie narusza, moim zdaniem, najbardziej istotnych cech ocenianej rozprawy: umiejętności właściwego postawienia aktualnego problemu badawczego oraz poprawnego jego rozwiązania w granicach określonych celem badań. Oceniana rozprawa nosi cechy samodzielnego dorobku naukowo-badawczego Autorki. Zgłaszam przeto do Wysokiej Rady Wydziału Nauk Biomedycznych i Kształcenia Podyplomowego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi wniosek o dopuszczenie mgr Agaty Sarniak do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Donna Kędan