

OCENA

Rozprawy doktorskiej Pani mgr Pauliny Kleniewskiej pt. „Udział endoteliny-1, oksydazy NADPH, oksydazy ksantynowej i kinazy białkowej C w procesie powstawania reaktywnych form tlenu”.

Choroby związane z dysfunkcją układu naczyniowego są oprócz chorób o podłożu nowotworowym jedną z najczęstszych przyczyn zgonów we współczesnym świecie. Identyfikacja w 1987 roku tlenku azotu jako czynnika relaksacyjnego naczyń krwionośnych (EDRF) było krokiem milowym w poznaniu tego szlaku metabolicznego w patogenezie chorób o podłożu naczyniowym. Odkrycie to zaowocowało nagrodą Nobla przyznaną w roku 1998. W roku 1988, rok później japońscy badacze wyizolowali i określili podstawowe własności biologiczne endotelin, peptydów o bardzo złożonej i wielorakiej funkcji fizjologicznej, przeciwstawnej do działania tlenku azotu. Te dwa odkrycia dokonane praktycznie w jednym czasie rzuciły nowe światło na rolę śródbłonka naczyniowego i jego roli w patofizjologii chorób naczyniowych i hemostatycznych. Zasadne więc wydaje się poszukiwanie nowych kierunków terapeutycznych mających na celu kontrolę nad funkcjonowaniem układu naczyniowo-śródbłonkowego w kontekście wielu schorzeń o podłożu naczyniowym.

Koncepcja rozprawy doktorskiej Pani mgr Pauliny Kleniewskiej jest godna uznania. Badania podjęte przez Doktorantkę i Promotora doskonale wpisują się w główny nurt badań prowadzonych przez zespół Pani Prof. dr hab. Anny Gorącej, kierownika Zakładu Fizjologii Układu Krążenia Katedry Fizjologii Doświadczalnej i Klinicznej UM w Łodzi. Badania są w znacznej mierze są kontynuacją uprzednio prowadzonych badań dotyczących udziału endoteliny 1 w warunkach stresu oksydacyjnego.

Przedstawiona mi do oceny praca jest bardzo obszernym opracowaniem, liczącym 174 strony, zawierającym 26 rycin/wykresów i 7 tabel. W pracy Doktorantka powołuje się na

260 pozycje literaturowe, których dobór nie budzi najmniejszych zastrzeżeń. Spośród cytowanych odnośników aż 65 pochodzi z ostatnich 5 lat, co może świadczyć o aktualności badań dokonywanych w prezentowanej pracy.

Praca doktorska Pani mgr Pauliny Kleniewskiej ma klasyczny układ. Rozpoczynając ją Część Teoretyczna nazwana przez Doktorantkę Wstępem, jest obszernym, 33 stronicowym opracowaniem zawierającym 4 bardzo pomocne schematy, 1 tabelę i 18 schematów reakcji chemicznych, zawiera 1 stronicowe wprowadzenie i oparta jest na ok. 170 cytowaniach. Część Teoretyczna podzielona jest na 6 podrozdziałów i jest ona w swojej treści idealnie dobrana do całości dysertacji. Ze szczególnym uznaniem odnoszę się do podrozdziału poświęconemu endotelinom, gdzie Doktorantka podaje pełen opis dotychczasowego stanu wiedzy dotyczącego tych peptydów podając rys historyczny ich poznania, syntezę, dane odnośnie receptorów endotelinowych i ich ekspresji na powierzchni komórek oraz szeroko opisuje udział endotelin w patogenezie chorób sercowo-naczyniowych oraz ich potencjalny udział w generowaniu stresu oksydacyjnego. Pozostała, zasadnicza część Części Teoretycznej poświęcona jest stresowi oksydacyjnemu. Autorka szczegółowo przedstawia reaktywne formy tlenu, ich źródła w układzie biologicznym oraz mechanizmy obrony antyoksydacyjnej. Dużo miejsca poświęca mechanizmom powstawania stresu oksydacyjnego, zarówno w warunkach fizjologicznych jak i w stanie zapalnym i niedotlenieniu tkanek.

Po przedstawieniu Części Teoretycznej, Doktorantka przedstawia uzasadnienie podjęcia badań i formułuje trzy jednoznacznie określone cele:

- Zbadanie wpływu dożylnie podanej endoteliny 1 na tworzenie wolnych rodników w sercu i płucach szczura na podstawie wybranych markerów stresu oksydacyjnego,
- Zbadanie mechanizmu receptorowego działania endoteliny 1 w narządach wewnętrznych szczura,
- Określenie źródła generowania reaktywnych form tlenu w warunkach podania dożylnego endoteliny 1.

Mam tu zastrzeżenie stylistyczne, egzogenne może być pochodzenie związku, a nie sposób ich podania.

Dodatkowym celem pracy była ocena ciśnienia tętniczego krwi zwierząt (skurczowego, rozkurczowego i średniego) w warunkach ekspozycji na endotelinę 1.

Materiał badawczy opisany jest na 4 stronach tekstu. Doktorantka charakteryzuje zwierzęta laboratoryjne i ich przygotowanie do przeprowadzenia doświadczeń oraz procedurę preparowania narządów. Szczegółowo charakteryzuje 10 grup zwierząt doświadczalnych użytych w przeprowadzonych badaniach. Pragnę nadmienić, że prezentowane grupy zwierząt doświadczalnych są bardzo dobrze dobrane. Pewną wątpliwość budzi liczebność poszczególnych grup, ale liczba 6 osobników w grupie mieści się w ogólnie przyjętych standardach w tego typu badaniach.

Metody badawcze stosowane podczas wykonywania pracy opisane są należycie szczegółowo i jednoznacznie na 18 stronach tekstu. Zwraca uwagę odpowiednie dobranie oraz różnorodność i nowoczesność zastosowanych metod począwszy od standardowych metod stosowanych w postępowaniu ze zwierzętami, poprzez metody stosowane w biochemii, immunochemii i biologii molekularnej. Opisy i protokoły poprzedzone są krótkim ale wyczerpującym wstępem teoretycznym, bardzo przydatnym podczas lektury tej części dysertacji. W części tej brakuje opisu pozyskiwania krwi obwodowej zwierząt, podstawowego materiału do dwóch parametrów określanych w pracy. Informacja ta jest wprawdzie podana w streszczeniu pracy na stronie 139, ma jednak lakoniczny charakter streszczeniowy. Rozumiem, że takt ten zaistniał przez przeoczenie Autorki. Brak szczegółowej informacji na temat ilości pobieranej krwi jest o tyle istotna, że stanowi o ograniczeniach w pozyskiwaniu materiału badawczego, z drugiej strony, fakt pobierania krwi może mieć wpływ na oznaczane ciśnienie tętnicze, istotny parametr oznaczany w pracy i dyskutowany później w Dyskusji.

Badania przeprowadzone przez Panią mgr Paulinę Kleniewską zaowocowały obfitością wyników. Zostały one przedstawione na 67 stronach tekstu rozprawy, doskonale zaprezentowane w postaci 22 bardzo starannie wykonanych rycin/wykresów oraz 6 tabel. Z dużym uznaniem odnoszę się do formy ich przedstawienia. Ich prezentacja jest bardzo czytelna i łatwa w odbiorze a jednocześnie oszczędna w tekście.

Doświadczenia opisane i przeprowadzone w pracy zostały logicznie zaplanowane, konsekwentnie wykonane i wnikliwie przedyskutowane. Podstawowy cel pracy, jakim było określenie generowania stresu oksydacyjnego wywołanego podaniem dożylnym endoteliny 1 został osiągnięty i scharakteryzowany poprzez zastosowanie kilku uzupełniających się metod. Do oceny generowania stresu oksydacyjnego w tkankach zwierząt doświadczalnych po podaniu dożylnym endoteliny 1 Doktorantka analizowała wskaźnik procesu peroksydacji lipidów, oznaczała stężenie nadtlenu wodoru, oznaczała stężenie wolnych grup SH, oznaczała stężenie glutationu całkowitego, utlenionego i zredukowanego oraz oznaczała parametr określany jako stężenia białka całkowitego. Dodatkowo oznaczany był czynnik martwicy nowotworów TNF- α . W osoczu zwierząt doświadczalnych oznaczany był poziom TBARS jako wskaźnik procesu peroksydacji lipidów oraz zdolność antyoksydacyjna metodą FRAP. Taka liczba oznaczanych parametrów wydaje się być wystarczająca do oceny przebiegu procesu generowania stresu oksydacyjnego, choć doskonałym uzupełnieniem byłoby oznaczenie np. poziomu generowania nitrotyrozyny, parametru powszechnie traktowanego jako reprint działania tlenu azotu i anionorodnika ponadtlenkowego. Doktorantka w dyskusji wielokrotnie podnosi kwestię wzmożonej syntezy tlenu azotu, który to rodnik w obecności podwyższonej podaży anionorodnika ponadtlenkowego prowadzi do syntezy toksycznego nadtlenoazotynu nitrującego białka. Tak uzyskane wyniki mogłyby wnieść dużo informacji o wymienionych procesach fizjologicznych i znacznie uporządkować dyskusję uzyskanych wyników. Na miejscu byłoby również oznaczenie przynajmniej jednego z enzymów metabolizmu tlenowego, tym bardziej, że uzyskiwane krwinki czerwone z pozyskiwanej krwi od zwierząt doświadczalnych pozostały niewykorzystane. W tym miejscu prosiłbym również o wyjaśnienie, jakie znaczenie fizjologiczne w kontekście generowania stresu oksydacyjnego ma oznaczanie tzw. białka całkowitego w badanych tkankach.

Analizując wyniki dotyczące stężenia TBARS umieszczone w tabeli 4 na str. 95 zauważyłem znaczne rozbieżności ich wartości w poszczególnych grupach zwierząt doświadczalnych. W przypadku TBARS (grupa otrzymująca bloker endoteliny ET_B i grupa zwierząt otrzymująca inhibitor oksydazy ksantynowej – allopurinol) różnice te dochodzą

prawie do 95%. Czym Doktorantka tłumaczy aż taką różnicę w wartościach tego oznaczanego parametru?

Dyskusja wyników przedstawiona przez Panią mgr Paulinę Kleniewską jest bardzo mocną stroną prezentowanej rozprawy doktorskiej. Jest przedstawiona na 24 stronach tekstu, podzielona na 19 działów, co znacznie ułatwia czytelnikowi odniesienie się do jej treści. Oparta na ok. 170 cytowaniach, w przeważającej części pochodzących z ostatnich 5 lat sprawia, że jest ona rzetelną konfrontacją uzyskanych wyników z dostępnymi danymi literaturowymi. Jest bardzo dobrze przeprowadzona, dojrzała i wyważona, co jest świadectwem dobrego odczytania Doktorantki i jej dojrzałości naukowej. Uzupelniona, może stanowić podstawę do doskonałego artykułu przeglądowego. W świetle uzyskanych wyników, wnikliwej dyskusji sformułowanie przez Doktorantkę 8 wniosków wydaje się być w pełni uzasadnione.

Kończąc ocenę formalną i merytoryczną ocenę rozprawy doktorskiej Pani mgr Pauliny Kleniewskiej pragnę stwierdzić, że recenzowana praca bardzo mi się podobała. Cała rozprawa jest napisana z dużą starannością, bardzo ładną polszczyzną co sprawia, że jest ona bardzo łatwa w odbiorze. Ze względów formalnych wypada mi w tym miejscu odnieść się do błędów, literówek i uchybień edytorskich, które znalazły się w tekście recenzowanej pracy. Pomimo tego, że bardzo się starałem, znalazłem ich niewiele. Nie będę się do nich w tej chwili odnosił bowiem z żaden sposób nie wpływają one na merytoryczną ocenę pracy. Pełną ich listę przekazałem Doktorantce w oddzielnym zestawieniu.

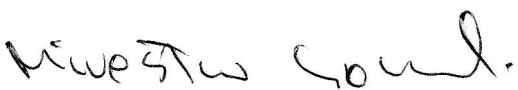
Publiczna obrona rozprawy doktorskiej i przedstawienie niezależnych recenzji rozprawy doktorskiej jest doskonałą okazją do oceny życiorysu naukowego Doktoranta oraz Jego dorobku naukowego. W tym miejscu chciałbym się odnieść zarówno do bogatego życiorysu naukowego Pani mgr Pauliny Kleniewskiej jak i do Jej dorobku publikacyjnego. Pani mgr Paulina Kleniewska jest autorem aż 14 publikacji już opublikowanych (w tym 4 w druku bądź przyjętych do druku) oraz 2 prac, które są na etapie redagowania manuskryptu. Z tych 14 publikacji w przypadku 4 prac jest Ona pierwszym autorem. Całkowity współczynnik oddziaływanie IF prac już opublikowanych wynosi ok. 19,81 (218 punktów MNiSW), jest to więc liczba, która bardzo często jest

wystarczająca w pracach zgłaszanych na stopień doktora habilitowanego. Prace Jej autorstwa/współautorstwa były cytowane ponad 25 razy, a indeks Hirscha wynosi 3. W czasie odbywania studiów magisterskich i doktoranckich brała udział w 7 konferencjach naukowych. Niezbyt duża liczba doniesień zjazdowych podkreśla, moim zdaniem pozytywną tendencję raczej do publikowania uzyskanych wyników w miejsce prezentowania ich na wszystkich możliwych zjazdach. Doktorantka była laureatem stypendium dla najlepszych doktorantów a w roku 2012 otrzymała zespołową nagrodę I stopnia Rektora UM za cykl publikacji.

Podsumowując, wysoko oceniam wartość merytoryczną pracy nie tylko ze względu na wagę podjętego tematu, ale przede wszystkim, ze względu na dobry warsztat metodyczny, staranność wykonania doświadczeń oraz znaczenie uzyskanych wyników. Nie bez znaczenia jest również bardzo bogaty życiorys naukowy Pani mgr Pauliny Kleniewskiej oraz Jej imponujący dorobek publikacyjny.

W mojej ocenie mgr Paulina Kleniewska podjęła bardzo ciekawy i ważny temat, zrealizowała postawione sobie cele badawcze, a zastosowanie przez Doktorantkę różnorodnych technik świadczy o dobrym opanowaniu warsztatu badawczego. Sposób analizy wyników, wnioskowanie oraz przedstawione hipotezy świadczą o dużej wiedzy oraz dojrzałości naukowej Doktorantki. Praca niewątpliwie zawiera elementy nowości, doświadczenia zostały zaplanowane i przeprowadzone zgodnie z przyjętymi standardami rzemiosła naukowego, natomiast uzyskane wyniki mogą stanowić doskonałą inspirację do kontynuowania badań w tej tematyce. Przedstawiona mi do oceny praca spełnia i to z nadmiarem absolutnie wszystkie wymagania określone w art. 16 i 17 Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65 z późniejszymi zmianami). Z uwagi na fakt, że większość wyników została opublikowana, decyzję o wyróżnieniu rozprawy doktorskiej Pani mgr Pauliny Kleniewskiej w kontekście uwag w niniejszej recenzji, uzależniam od przebiegu obrony i pozostawiam Wysokiej Radzie Uniwersytetu Medycznego.

Mam zatem przyjemność przedstawić wniosek do Wysokiej Rady Uniwersytetu Medycznego w Łodzi o dopuszczenie mgr Pauliny Kleniewskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.


Prof. dr hab. Mirosław Soszyński

Łódź, 29 lipca 2013 r.