

Recenzja rozprawy doktorskiej lek. Macieja Śledzińskiego

pt.: „Stres oksydacyjny – rola labilnej puli żelaza w modelu komórkowym ostrego zapalenia trzustki”

Ostre zapalenie trzustki (OZT) jest schorzeniem rozwijającym się w następstwie przedwczesnej aktywacji proenzymów trzustkowych prowadzącej do samotrąwienia trzustki, a często również okolicznych tkanek. Liza tkanek wyzwała silną reakcję zapalną, która w niektórych przypadkach może przerodzić się w zespół uogólnionej reakcji zapalnej wiązany z wysokim ryzykiem niewydolności wielonarządowej. W ostatnich latach notuje się wzrost częstości występowania OZT, co prawdopodobnie związane jest z postępującą epidemią otyłości będącej istotnym czynnikiem ryzyka rozwoju kamicy żółciowej. Pomimo znacznego postępu w medycynie, ciężkie OZT wciąż pozostaje niebezpiecznym schorzeniem obciążonym wysokim odsetkiem zgonów i powikłań. Jednym z mechanizmów odpowiedzialnych za rozwój OZT, działającym na bardzo wczesnym etapie choroby, jest nasilenie produkcji reaktywnych form tlenu skutkujące pojawieniem się stresu oksydacyjnego. Mając na uwadze powyższe, wybór tematyki badań Doktoranta należy uznać za jak najbardziej uzasadniony.

Przedmiotem rozprawy doktorskiej przedstawionej mi do oceny było określenie znaczenia labilnej puli żelaza w tworzeniu reaktywnych form tlenu w komórkowym modelu OZT indukowanego przez ceruleinę. Dodatkowym, istotnym celem była ocena roli szlaku kinazy JNK oraz czynności proteasomów w zmianach labilnej puli żelaza w badanym modelu doświadczalnym. Tytuł rozprawy nie odzwierciedla jednak do końca zakresu pracy. Doktorant nie badał bowiem stresu oksydacyjnego jako takiego, a jedynie ilość reaktywnych

form tlenu. Wzrost tempa ich produkcji może, ale nie musi, oznaczać pojawienia się stresu oksydacyjnego.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska ma układ typowy dla tego rodzaju dysertacji. W obszernym wstępie Doktorant na początku przedstawia etiologię, przebieg oraz mechanizmy odpowiedzialne za rozwój ostrego zapalenia trzustki. W kolejnym podrozdziale szczegółowo opisane zostały reaktywne formy tlenu oraz procesy ich powstawania. Ta część wstępu opatrzona jest kilkoma przejrzystymi rycinami, które znacząco ułatwiają zrozumienie omawianych zagadnień. W dalszej części wstępu Autor zapoznaje czytelnika ze zwierzęcymi modelami OZT, właściwościami wykorzystanej w badaniach linii komórek AR42J oraz procesem transfekcji DNA. W ostatnich dwóch podrozdziałach Doktorant opisał homeostazę żelaza i jego udział w tworzeniu reaktywnych form tlenu oraz szlaki sygnałowe kinaz białkowych aktywowanych przez mitogeny.

W mojej opinii wstęp, chociaż ciekawy, jest stanowczo zbyt obszerny. Obejmuje on aż 42 strony, czyli więcej niż materiał i metody, wyniki oraz dyskusja razem wzięte. Część zamieszczonych w nim informacji nie jest niezbędna do zrozumienia treści rozprawy i z powodzeniem mogłaby zostać usunięta. Na przykład nie widzę potrzeby opisywania zwierzęcych modeli OZT skoro badania zostały przeprowadzone na modelu komórkowym. Pominąć można było również przedstawienie procesu transfekcji DNA, a opis kinaz białkowych aktywowanych przez mitogeny ograniczyć do kinaz JNK.

We wstępie Doktorant nie ustrzegł się kilku błędów wynikających z dosłownego tłumaczenia terminologii w języku angielskim. Za przykład mogą posłużyć sformułowania takie jak: „indywidua chemiczne”, „wydzielanie granulatu”, „specyfikacje enzymatyczne” czy „jamiste malformacje”. Dostyc często stosowany był również nieprawidłowy szyk wyrazów właściwy językowi angielskiemu, np. „bakteryjna translokacja” czy „genetyczne mutacje”. Niewłaściwe jest również sformułowanie „estry etylowych kwasów tłuszczowych”, prawidłowa nazwa tych związków to estry etylowe kwasów tłuszczowych. Nigdy wcześniej nie spotkałem się również z czymś takim jak „szlak wrażliwy na napięcie jonowe”. W części opisującej metabolizm żelaza Doktorant wielokrotnie używa też nieprawidłowego terminu hemostaza zamiast homeostaza. W podrozdziałach o tytułach: „Labilna pula żelaza”, „Ferrytyna jako źródło labilnej puli żelaza” oraz „Kinazy JNK” zamieszczono również całe akapity tekstu nieopatrzzonego żadnymi cytowaniami.

Część pracy poświęcona metodyce badań została przygotowana bardzo starannie. Doktorant szczegółowo opisuje tu warunki w jakich hodowane były komórki oraz metodę pomiaru ilości reaktywnych form tlenu, wielkości labilnej puli żelaza i zawartości badanych

białek. Wyczerpująco przedstawiony został również proces namnażania i oczyszczania plazmidów oraz transfekcji komórek. Wykorzystane procedury są opisane w sposób jasny i przejrzysty. Na podkreślenie zasługuje szeroki wachlarz metodyczny Doktoranta obejmujący zaawansowane techniki takie jak transfekcja komórek, cytometria przepływowa i mikroskopia fluorescencyjna. Dobór modelu doświadczalnego, metod badawczych, oraz sposób zaplanowania poszczególnych eksperymentów jest prawidłowy i w pełni adekwatny do celów jakie zostały przedstawione w rozprawie.

W rozdziale tym wkradły się jednak drobne błędy. Opisując parametry wirowania Doktorant używa terminu prędkość podając następnie wartość przeciążenia. Niewłaściwie podany został również skład atmosfery w jakiej hodowane były komórki. Gdyby zawierała ona aż 95% tlenu doszłoby do indukcji silnego stresu oksydacyjnego i aktywacji apoptozy. Wskazane byłoby również zamieszczenie informacji odnośnie tego w ilu powtórzeniach były wykonywane eksperymenty i na czym dokładnie polegały te powtórzenia (czy były to niezależne doświadczenia wykonywane w różnych dniach czy też oddzielne dołki lub płytki w trakcie jednego eksperymentu).

Pewne wątpliwości budzi również dobór metod statystycznych. W znacznej części doświadczeń zastosowano więcej niż jeden czynnik międzygrupowy, w tych przypadkach wskazane byłoby zastosowanie wieloczynnikowej, a nie jednokierunkowej, analizy wariancji. W przypadku analizy statystycznej wyników pomiaru zawartości białka ferrytyny, ze względu na obecność więcej niż dwóch grup doświadczalnych, należało zastosować analizę wariancji połączoną z testem porównań wielokrotnych. Użycie testu t-Studenta jest tu niewłaściwe ze względu na brak kontroli błędu I rodzaju.

Wyniki uzyskane w rezultacie przeprowadzonych eksperymentów Doktorant zaprezentował na 8 przejrzystych rycinach. Rezultaty badań zostały opisane w sposób jasny i zwarty, a kolejność omawianych eksperymentów tworzy logiczny ciąg co znacznie ułatwia ich zrozumienie. W pierwszej części tego rozdziału Autor wykazał, że podanie ceruleiny nasila produkcję reaktywnych form tlenu w komórkach AR42J, oraz że zjawisko to, przynajmniej w części, jest konsekwencją wzrostu wielkości labilnej puli żelaza. W tytule podrozdziału 5.1 Doktorant stwierdza, że ceruleina wywołała stres oksydacyjny. Przeprowadzone badania nie uzasadniają jednak użycia takiego sformułowania, nie były tu bowiem analizowane żadne markery tego stresu.

W dalszej części rozdziału Autor opisał wyniki dowodzące, że wzrost labilnej puli żelaza indukowany przez ceruleinę jest konsekwencją zmniejszenia zawartości ferrytyny w komórkach AR42J. Kolejne doświadczenia przedstawione w rozprawie wykazały, że

zjawisko to zachodzi przy udziale proteasomów oraz kinazy JNK1. W tytułach rycin przedstawiających zmiany zawartości ferrytyny Doktorant używa sformułowania „degradacja ferrytyny”, które pomimo iż wydaje się znajdować uzasadnienie w wynikach, w mojej opinii w tym przypadku nie jest właściwe. Analiza zawartości białka ferrytyny metodą Western blot nie daje bowiem żadnych informacji odnośnie tego czy obserwowane trendy są konsekwencją nasilenia jego degradacji czy też ograniczenia tempa syntezy. Da się również zauważyć pewną niekonsekwencję w stosowaniu symboli oznaczających istotność statystyczną różnic na wykresach słupkowych. Np. na rycinie 9D nie została ona zaznaczona, podczas gdy na rycinach 11D i 14B zaznaczone zostały różnice z wartością prawdopodobieństwa przekraczającą założoną granicę istotności statystycznej.

Dyskusja wyników jest pogłębiona, a Doktorant krytycznie interpretuje zgromadzone dane, opierając się o adekwatnie dobrane piśmiennictwo, co świadczy o dobrej znajomości tematu. Na podkreślenie zasługuje również analiza implikacji klinicznych uzyskanych wyników oraz nakreślenie dalszych kierunków badań. Rozdział ten jest niewątpliwie jednym z najmocniejszych punktów ocenianej rozprawy. Zastrzeżenia, podobnie jak wcześniej, budzą jedynie sformułowania sugerujące, że w trakcie badań określano tempo degradacji ferrytyny, podczas gdy analizowano jedynie jej zawartość.

Wnioski stanowią adekwatne podsumowanie wyników badań i ich komentarza zawartego w dyskusji oraz w pełni odpowiadają celom rozprawy. Zostały one prawidłowo sformułowane, mają również dostateczne potwierdzenie w danych eksperymentalnych.

Rozprawa lek. Macieja Śledzińskiego, stanowiąca podstawę postępowania doktorskiego, jest oryginalnym rozwiązaniem problemu naukowego i dowodzi, że Doktorant nabył odpowiednie kompetencje umożliwiające samodzielne prowadzenie badań naukowych. Natomiast forma w jakiej dysertacja została przygotowana świadczy o szerokiej wiedzy Doktoranta w zakresie podjętej tematyki badawczej. Niewielkie niedociągnięcia wyszczególnione w niniejszej recenzji nie umniejszają wysokiej wartości naukowej ocenianej pracy stanowiącej cenne uzupełnienie wiedzy odnośnie mechanizmów odpowiedzialnych za rozwój OZT.

W związku z powyższym, stwierdzam że praca przedstawiona mi do oceny spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim wymienione w art. 13 Ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2003.65.595 z póź. zm.). Na tej podstawie wnioskuję do Rady Wydziału Nauk o Zdrowiu z Oddziałem Pielęgniarstwa i Instytutem Medycyny Morskiej i Tropikalnej Gdańskiego

Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie lek. Macieja Śledzińskiego do dalszych etapów postępowania doktorskiego i publicznej obrony.

Wniosek o wyróżnienie rozprawy doktorskiej. MB

Białystok, 24 listopada 2017 r.

Dr hab. n. med. Marcin Baranowski

MB

Zakład Fizjologii

Wydział Lekarski z Oddziałem Stomatologii

i Oddziałem Nauczania w Języku Angielskim

Uniwersytet Medyczny w Białymstoku