

Warszawa, dn. 04.12.2017 r.

Prof. dr hab. n. med. Józef Langfort
Zakład Farmakologii Doświadczalnej
IMDiK im. Mirosława Mossakowskiego
ul. Pawińskiego 5
02-106 Warszawa

**Ocena rozprawy doktorskiej lek. med. Macieja Zbigniewa Śledzińskiego pod tytułem
„Stres oksydacyjny – rola labilnej puli żelaza w modelu komórkowym ostrego zapalenia
trzustki.”**

Ostre zapalenie trzustki jest nienowotworową chorobą o gwałtownym przebiegu i znacznej śmiertelności (ok. 5 % przypadków), indukowaną szeregiem dobrze już rozpoznanych patogennych czynników mechanicznych, toksycznych, metabolicznych oraz przebytymi chorobami i słabiej rozpoznanymi czynnikami genetycznymi. Efektem ich patologicznego oddziaływania jest aktywacja proenzymów trzustkowych, w wyniku której rozwija się proces lizy tego narządu z towarzyszącą mu silną reakcją zapalną lokalną i w większości przypadków także ogólnoustrojową. Może przerodzić się w postać przewlekłą. Obie postacie zapalenia trzustki powodują jej stopniowe uszkodzenie, co w konsekwencji prowadzi do upośledzenia lub/i zaprzestania pełnienia jej fizjologicznych funkcji. Około 10 do 30% zachorowań ma charakter idiopatyczny. W tym ostatnim przypadku rozpoznanie przyczyn i mechanizmów tej choroby w trakcie obserwacji klinicznych cechują znaczne ograniczenia. Dotyczy to zwłaszcza wczesnego stadium choroby oraz jej stadium przedklinicznego. Do rozwiązania, przynajmniej częściowego tej kłopotliwej sytuacji mogą przyczyniają się badania z wykorzystaniem eksperymentalnych modeli ostrego zapalenia trzustki. W tym obszarze badań dotychczas najczęściej stosowano zarówno inwazyjne jak i nieinwazyjne modele zwierzęce. Autor recenzowanej dysertacji rozszerzył ten zakres badań podstawowych o model z wykorzystaniem linii komórkowej AR42J, pozyskanej ze zbiorów The American Type Culture Collection (pancreatoma, ATCC CRL 1492). Jest to linia komórkowa, zachowująca wiele cech komórek groniastych tego narządu, m. in. wydzielanie hormonów trawiennych i jest używana jako model egzokrynnego zapalenia trzustki, szczególnie w badaniach nad regulacją szlaków sygnałowych skojarzonych z ekspresją cytokin, powstawania reaktywnych form tlenu i śmieci komórek. Wykorzystując ten model i techniki biologii molekularnej Kandydat postanowił zbadać ewentualny udział labilnej puli żelaza w tworzeniu reaktywnych form tlenu w przebiegu doświadczalnego ostrego zapalenia

Dziewięć Wydział Nauk o Zdrowiu

12 GRU. 2017

Wpł. dnia.....

Nr-DNZ/ 157/2017.....

trzustki indukowanego ceruliną ze szczególnym uwzględnieniem zbadania w tym procesie udziału kinazy c-Jun (JNK) i czynności proteosomów. W celu zrealizowania tego programu badawczego traktowano komórki cerulina, związkami chelatującymi – deferoksaminą i heminą. Warto podkreślić, że indukowane ceruliną zapalenie trzustki uznawane jest za łagodną postać tej choroby. Rola wzmożonej produkcji reaktywnych form tlenu w patomechanizmie tej choroby a szczególnie w początkowym okresie jej rozwoju jest dosyć dobrze udokumentowana. Jednakże, źródła reaktywnych form tlenu w przebiegu ostrego zapalenia trzustki nie są dobrze poznane. Rozszerzenie badań nad tym zagadaniem o ewentualny udział w ich generacji żelaza jest próbą rozpoznania udziału nowego mechanizmu w patogenezie tej choroby. Świadczą o tym następujące fakty bibliometryczne. W odpowiedzi na hasło „acute pancreatitis iron” w bazie Pub Med. (z dn, 09.12.2017 r,) pojawia się 44 publikacji, a po zawężeniu do „acute pancreatitis iron oxidative stres” tylko 4. Natomiast w odpowiedzi na hasło „acute pancreatitis labile iron” tylko jedna publikacja, której Kandydat, co należy podkreślić, jest pierwszym autorem a promotor autorem seniorem (Śledziński i wsp. 2013, Pancreas 42, 1070-1077). Co istotne, w odpowiedzi na rozszerzeniu tego ostatniego hasła do „acute pancreatitis labile iron oxidative stress” nie pojawia się żadna publikacja. Powyższe dane jednoznacznie wskazują, że podjęta przez Doktoranta tematyka badania jest z całą pewnością oryginalna.

Rozprawa liczy 107 stron i podzielona jest na 10 głównych rozdziałów. W spisie cytowanych publikacji autor umieścił 171 pozycji w zasadzie będącymi najnowszymi oryginalnymi pracami eksperymentalnymi ogłoszonymi drukiem w czasopismach o zasięgu światowym. Praca ma typowy układ dla rozpraw doktorskich.

We Wstępie Doktorant, opierając się na przeglądzie piśmiennictwa, wprowadza czytelnika w zagadnienia dotyczące anatomii i funkcji trzustki a następnie etiologii, przebiegu oraz patologii ostrego zapalenia trzustki, po czym opisuje mechanizmy leżące u podstaw powstawania reaktywnych form tlenu. Opis zwierzęcych modeli tej choroby oraz właściwości linii komórkowej AR42J wraz z procesem transfekcji plazmidowym DNA to kolejne podrozdziały wstępu. W kolejnych akapitach opisuje udział żelaza w powstawaniu reaktywnych form tlenu oraz szlaki sygnałowe kinaz białkowych aktywowanych przez mitogeny. Wstęp jest podzielony na podrozdziały, powiązane ze sobą logicznie, a zagadnienia omawiane w następnym rozdziale wynikają z treści poprzedniego. Wzbogacono go kilkoma czytelnymi rycinami. Wybór przedstawionych we Wstępie zagadnień i kolejność ich prezentacji podporządkowany jest celowi pracy i jest bardzo obszernym oraz przekonującym uzasadnieniem dla zaproponowanego celu badań. Być może niepotrzebnie

zawiera trochę informacji o charakterze podręcznikowym, ale za to w tej wersji nadają się do przedstawienia w publikacji przeglądowej. Znalazłem w nim także kilka przejęzyczeń terminologicznych, prawdopodobnie jako efekt dosłownego tłumaczenia tych pojęć z języka angielskiego, np. „wydzielanie granulatu, „indywidua chemiczne, itp., na które zwróciłem uwagę Doktorantowi podczas osobistej rozmowy. Cel pracy oraz pytania szczegółowe cele badawcze wynikają z przeprowadzonego rozumowania przedstawionego we Wstępie i nie budzą zastrzeżeń. Bardzo starannie opisano metodykę badań, która opierała się na zastosowaniu bardzo nowoczesnych i czułych metod, np., transfekcji komórek, cystometrii przepływowej czy mikroskopii fluorescencyjnej. Uważam, że wybrano je poprawnie do zrealizowania założonego celu badań. W tym rozdziale brakuje jednak danych dotyczących ilości powtórzeń w wykonywanych pomiarach przy wykonywaniu niektórych oznaczeń. Udokumentowany opis wyników analizą statystyczną (uwagi zostaną zamieszczone poniżej) przedstawiono w 8 rycinach, które skonstruowano w sposób przejrzysty i łatwy do odczytania.

Dyskusja stanowi logiczną całość i została poprowadzona zgodnie z kolejnością prezentowanych wyników. Swoje wyniki Autor skomentował opierając się na publikacjach, w tym z ostatnich lat, zamieszczonych w piśmiennictwie światowym. Zwraca uwagę fakt skomentowania uzyskanych wyników w kontekście ewentualnych implikacji klinicznych. Jak już wykazałem, z powodu braku piśmiennictwa *stricte* związanym z celem badań Doktorant nie mógł analizować uzyskanych wyników z podobnymi z tego zakresu badań. Cała dyskusja choć krótsza niż wstęp, co nieco zaburza formalną strukturę dysertacji, dowodzi, że lek. med. Maciej Śledziński ze starannością przestudiował zagadnienia związane z podjętą tematyką badań. Uważam, że jest to także najlepiej napisany rozdział tej rozprawy. Zwięzłe podsumowanie wyników badań stanowią 4 wnioski. Za szczególnie ważne uważam wykazanie, że we wczesnym okresie choroby występuje rozpad ferrytyny i co zatem idzie wzrost labilnej puli żelaza i produkcji reaktywnych form tlenu, oraz udziału w tym procesie proteasomów. Ważne jest też wykazanie, że deferoksamina oraz inhibitory proteasomów mogą zapobiegać niekorzystnemu wzrostowi labilnej puli żelaza a związki blokujące szlak sygnałowy zależny od kinazy JNK1 mogą ograniczać produkcję reaktywnych form tlenu w doświadczalnie wywołanym ostrym zapaleniu trzustki. Reasumując, Kandydat wskazał, że zmiana stężenia żelaza może być dodatkowym, dotychczas nierozpoznanym źródłem reaktywnych form tlenu w przebiegu ostrego zapalenia trzustki. Ta konkluzja daje podstawę do podjęcia dalszych, także klinicznych badań nad tym zagadnieniem.

Uwagi krytyczne

Uważam, że Autor w sposób bezkrytycznie umieścił w tytule pojęcie stres oksydacyjny, bowiem w cyklu swoich doświadczeń badał tylko reaktywne formy tlenu. Chciałbym zatem, aby doktorant w czasie obrony dysertacji skomentował tę moją uwagę, szczególnie w kontekście publikacji Sies H: Total Antioxidant Capacity: Appraisal of Concept, J Nutr 2007,1493 oraz publikacji Bartosz G: Total Antioxidant Capacity, Adv Clin Chem 2003, 37, 219, a także skomentował pojęcia całkowitej pojemności antyoksydacyjnej (Total Antioxidant Capacity - TAC) i całkowitego statusu antyoksydacyjnego (Total Antioxydant Status) jako ważnych zmiennych, które oceniają status oksydacyjny organizmu. Ponadto prosiłbym także o komentarz w kwestii wyboru testu statystycznego. Dlaczego nie zastosowano analizy wieloczynnikowej?.

Ocena końcowa

Przedłożona do oceny rozprawa doktorska lek. med. Zbigniewa Śledzińskiego pod tytułem „Stres oksydacyjny – rola labilnej puli żelaza w modelu komórkowym ostrego zapalenia trzustki” jest oryginalnym, opartym o badania podstawowe osiągnięciem naukowym, zasługującym na bardzo wysoką ocenę. Przedstawiany projekt badawczy jest nowatorski, o potencjalnych implikacjach klinicznych.

Uważam, że lek. med. Maciej Zbigniew Śledziński spełnia wszystkie wymagane warunki o ubieganie się o stopień doktora nauk w dziedzinie nauk medycznych. Dlatego z prawdziwą przyjemnością przedstawiam Wysokiej Radzie Wydziału Nauk o Zdrowiu z Oddziałem Pielęgniarstwa i Instytutem Medycyny Morskiej i Tropikalnej wniosek o dopuszczenie Doktoranta do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Argumenty o znaczących zaletach merytorycznych tej dysertacji wskazałem w niniejszej recenzji. Stanowią one postawę do przedstawienia Wysokiej Radzie wniosku o wyróżnienie tej rozprawy. Dlatego w przypadku dojrzałego komentarza ze strony Kandydata dotyczącego uwag zawartych w mojej krytyce, będę miał pełną podstawę do złożenia wniosku o jej wyróżnienie.

