CENTRUM MEDYCZNE KSZTAŁCENIA PODYPLOMOWEGO
Klinika Otorynolaryngologii Dziecięcej
Adres:
Szpital Bielański
ul. Cegłowska 80, 01-809 Warszawa
tel.: (+48) 22 5690285
http://www.cmkp.edu.pl

Warszawa, 17.05.2021 r

Ocena rozprawy doktorskiej lek. Pawła Bieleckiego
pt.: „Ocena wpływu ekspozycji na dym tytoniowy na ekspresję czynników regulujących angiogenezę u myszy z wyciszonym genem 12/15-Alox"
przygotowana na prośbę Dziekana Wydziału Lekarskiego z Oddziałem Stomatologii i Oddziałem Nauczania w Języku Angielskim Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku.

Teoria onkogenezy w nowotworach głowy i szyi jest wieloetapowym procesem, w którym biorą udział egzogenne i endogenne czynniki rakotwórcze. Związek pomiędzy rakiem krtani a paleniem tytoniu po raz pierwszy został wykazany w latach 50-tych ubiegłego wieku. Wynder i wsp. stwierdzili, że palenie papierosów jest głównym czynnikiem ryzyka zachorowania na raka krtani.

W dymie tytoniowym zidentyfikowano prawie 4000 związków chemicznych, które prowadzą do patologicznej metaplazji płaskonabłonkowej nabłonka cylindrycznego i następowej dysplazji komórkowej z uszkodzeniem DNA komórki i wprowadzeniem błędu w kodzie genetycznym. Badania molekularne Kleinsassera w 2006 roku wykazały genotoksyczny efekt nikotyny. Dane te potwierdzają rakotwórczy mechanizm działania nikotyny jak stymulowanie angiogenezy i wzrost guza oraz hamowanie apoptozy.

Angoiogeneza jako proces biologiczny tworzenia nowych naczyń krwionośnych, odgrywa szczególną rolę w chorobach onkologicznych i przewlekłych chorobach zapalnych.

Podjęcie badań eksperymentalnych na modelu zwierzęcym oceniających wpływ dymu tytoniowego na proces angiogenezy uważam za zasadny i mający wpływ na postępowanie lecznicze w przypadku występowania groźnych chorób cywilizacyjnych.

Przedłożona mi do recenzji praca doktorska obejmuje 98 stron tekstu, 8 tabel, 8 rycin i 11 fotografii ilustrujących badanie. Maja one odpowiednie tytuły oraz objaśnienia użytych znaków i symboli. Zdjęcia i ryciny wzbogacają istotnie treść pracy i podnoszą jej wartość dydaktyczna. W części końcowej pracy załączony jest spis 176 pozycji piśmiennictwa głównie obcojęzycznego oraz streszczenia w języku polskim i angielskim.

Praca ma układ typowy dla dysertacji doktorskich z rozdziałami występującymi w prawidłowej kolejności, zapewniając właściwy rozwój narracji i konsekwencje wykładu obowiązujące w pracach naukowych.

W obszernym, obejmującym 28 stron pracy wstępie zawarte są opisy angiogenezy, czynniki regulujące ten proces oraz omówienie i rola najważniejszych czynników biorących udział w regulacji angiogenezy. Oddzielny podrozdział Autor poświecił omówieniu i określeniu funkcji 15-lipooksygenazy. Podaje jej położenie, historie odkrycia tego genu u człowieka oraz czynniki wpływające na ekspresje 15-LOX. Kończąc rozdział doktorant uzasadnia cel podjętych badań, podając 15-LOX jako enzym związany z syntezą metabolitów odpowiedzialnych za działania przeciwzapalne i prowadzące do ich ustąpienia, podkreśla również jego role w rozwoju i progresji nowotworów.

Autor podaje, że model mysi jest najczęściej wykorzystywany do oceny ekspresji genów. Wykorzystanie podobieństwa genów u ludzi i myszy pozwala na lepsze zrozumienie jego roli. Wyciszenie danego genu na modelu mysim pozwala lepiej zrozumieć funkcje homologicznego lub ortologicznego genu u człowieka.

Praca została wykonana w Centrum Medycyny Doświadczalnej UM w Białymstoku po uzyskaniu zgody Komisji Bioetycznej.

Celem pracy była ocena roli 12/15-LOX, będącej ortologiem ludzkiej 15-LOX w odpowiedzi tkanki płucnej na dym tytoniowy, ze szczególnym uwzględnieniem procesu zapalnego i przebudowy tkanek. W projekcie tym uwzględniono również ocenę ekspresji genów kodujących białka związane z regulacją angiogenezy.

Dla zrealizowania celów badania przeprowadzono eksperyment na 120 myszach, połowę(60 sztuk) stanowiły myszy z wyciszonym genem 12/15/Alox będącym mysim ortologiem ludzkiego genu 15LOX, drugą połowę zwierząt doświadczalnych stanowiły myszy dzikie tworzące grupę kontrolną. Ekspozycja na dym tytoniowy była przeprowadzana w różnych ramach czasowych od 6 godzin do 4 miesięcy.

Po zakończeniu eksperymentu od każdej myszy pobierano płuca, jedno do oceny ekspresji genów, drugie do badania histopatologicznego. Uzyskane wyniki badań poddano analizie statystycznej przy pomocy programu Statistica.

Rozdział 4 zawiera wyniki badań histopatologicznych oraz oceny ekspresji genów. Analiza histopatologiczna tkanki płucnej myszy dzikich wykazała istotnie statystycznie większe zmiany w postaci rozedmy oraz nacieku makrofagów po dłuższej ekspozycji na dym tytoniowy,

trwającej 4 miesiące w porównaniu do zmian po ekspozycji 4 tygodniowej. Podobne wyniki uzyskano w badaniach histopatologicznych myszy pozbawionych genu 12/15-lipooksygenazy. Porównanie zmian rozedmowych i nacieków makrofagów materiału pobranego od myszy dzikich i znokautowanych po 4 tygodniach i 4 miesiącach, wykazało zmiany statystycznie większe u myszy pozbawionych genu 12/15-lipooksygenazy.

Badając ekspresję genów związanych z angiogenezą w odpowiedzi na ekspozycje na dym tytoniowy wykazano, że wystąpiły zmiany w ekspresji już po 24 godzinach ekspozycji. Analiza ekspresji genów u myszy znokautowanych w porównaniu z dzikimi wykazała istotne różnice. Tylko 2 spośród 27 genów istotnych dla procesu angiogenezy miało podobną ekspresję zarówno w grupie myszy dzikich jak i znokautowanych. Były to gen kodujący endotaline oraz gen kodujący czynnik wzrostu fibroblastów. Pięć genów wykazało istotną przewagę ekspresji w grupie myszy dzikich w porównaniu z pozbawionymi genu 12/15-Alox. Były to geny kodujące interleukinę 1 beta, czynnik wzrostu śródbłonka naczyniowego, metaloproteinazę MMP9.

Istotne zmiany w ekspresji genów w grupie myszy dzikich wykazało 11 spośród 27 istotnych dla procesu angiogenezy. Prawie wszystkie z nich wykazały wzrost ekspresji już w pierwszej dobie eksperymentu. Jedynie gen kodujący kadherynę naczyniowo-śródbłonkową 5 wykazał wzrost ekspresji po 4 tygodniach ekspozycji na dym tytoniowy. Godnym podkreślenia jest fakt wzrostu ekspresji genów kodujących czynniki wzrostowe u myszy dzikich.

W grupie myszy pozbawionych genu 12/15Alox wykazano wzrost ekspresji tylko 6 genów. Były to głównie geny kodujące białka regulujące aktywność leukocytów, takie jak chemokiny oraz interleukina 6.

Geny wykazujące wzrost ekspresji na dym tytoniowy w grupie myszy dzikich wykazywały zmniejszenie ekspresji.

W oparciu o przeprowadzone badania doświadczalne wykazano, że gen 15-Lox odgrywa istotną role w regulacji odpowiedzi tkankowej na dym tytoniowy. Obserwowano większe uszkodzenie tkanki płucnej, większe nacieki makrofagów oraz większe nasilenie rozedmy. Wykazano, że gen 12/15 -Alox ma wpływ na ekspresję genów kodujących białka związane z angiogenezą i przebudową tkanek.

Dyskusja zawiera interesującą interpretację uzyskanych wyników. Omówienie wyników badań innych autorów przeprowadzone jest w sposób dojrzały, kompetentny i z dużą swobodą, świadczącą ze Autor doskonale zapoznał się z literatura opracowywanego zagadnienia.

Wnioski w liczbie 7 przeprowadzone są wnikliwie i rzeczowo. Odpowiadają na postawione w pracy cele, świadczą o prawidłowym wykorzystaniu rezultatów uzyskanych z przeprowadzonych badan.

Piśmiennictwo dobrane starannie, koresponduje z treścią dysertacji.

W podsumowaniu recenzowaną pracę oceniam bardzo dobrze - zarówno za wybór tematu, jak i jego rzetelną realizację.

Formułując ostateczny wniosek recenzji, stwierdzam, że w przedstawionej mi dysertacji występują wszystkie elementy określone przepisami o doktoryzacji, tj.:

1. Prawidłowe założenie zagadnienia naukowego
2. Samodzielne i przy użyciu właściwych metod rozwiązanie tego zagadnienia
3. Wystarczający zasób wiedzy
4. Odpowiednie wykorzystanie piśmiennictwa krajowego i obcego
5. Przeprowadzenie logicznej dyskusji i postawienie końcowych wniosków na podstawie uzyskanych wyników.

W mojej opinii rozprawa doktorska lek. Pawła Bieleckiego spełnia warunki określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki. (Dz.U.2003,65,595 z późń. zmianami w związku z art. 179 ust 1 Ustawy z dnia 3 lipca 2018 r.-przepisy wprowadzające Ustawę-Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U.2018,1669,z późn. zm.)

Zwracam się zatem do Senatu Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku o dopuszczenie lekarza Pawła Bieleckiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Prof. dr hab. n. med. Artur Niedzielski