Warszawa, dnia 07.05.2018

RECENZJA

rozprawy doktorskiej lek. Piotra Olbromskiego pt. „Wpływ ozonu na uwalnianie mikrocząstek pochodzenia erytrocytarnego, leukocytarnego, płytkowego, śródbłonkowego oraz na wybrane parametry układu hemostazy" wykonanej pod kierunkiem prof. dr hab. n. med. Piotra Radziwona

W przedstawionej do recenzji pracy Doktorant podjął się oceny wpływu ozonowania krwi pełnej na uwalnianie mikrocząstek pochodzących z erytrocytów, leukocytów, płytek krwi i śródbłonka oraz ich wpływu na układ hemostazy.

Praca ma układ typowy dla rozpraw doktorskich. Liczy ogółem 67 stron i zawiera 51 pozycji piśmiennictwa, z których większość pochodzi z renomowanych czasopism zagranicznych i była opublikowana w ciągu ostatnich 10 lat. Praca napisana jest poprawnym językiem i jest dobrze przygotowana pod względem edytorskim. Tekst uzupełniony jest 21 rycinami. Czytanie pracy ułatwia zamieszczony na początku „Wykaz skrótów".

W liczącym 15 stron „Wstępie" Doktorant opisuje budowę, pochodzenie, mechanizm powstawania i działania oraz znaczenie kliniczne mikrocząstek. Przedstawia również zagadnienie ozonowania krwi i jej znaczenie w medycynie. „Wstęp" jest napisany w sposób przejrzysty w oparciu o dobrze dobrane piśmiennictwo.

Doktorant w swojej pracy postawił do rozwiązania trzy podstawowe cele. Pierwszym z nich była ocena wpływu ozonowania krwi pełnej na uwalnianie mikrocząstek pochodzących z erytrocytów (EMP), leukocytów (LMP), płytek krwi (PMP) oraz komórek śródbłonka (ŚMP). Drugim celem była ocena wpływu ozonowania krwi pełnej na wybrane parametry układu hemostazy, zaś trzecim celem była ocena korelacji ilości generowanych pod wpływem ozonu mikrocząsteczek z wybranymi parametrami układu hemostazy.

Materiałem do badań była krew żylna pobrana w ilości 80 ml od 20 zdrowych osób, po wyrażeniu przez nich świadomej, pisemnej zgody na udział w badaniu. Po pobraniu krew rozdzielana była na 4 części. Grupę kontrolną stanowiła krew nie poddana procedurze napowietrzania ani ozonowania (grupa K), drugą grupę poddawano działaniu powietrza atmosferycznego (grupa P), trzecią działaniu ozonu w niskiej dawce (grupa O1), czwartą działaniu ozonu w wysokiej dawce (grupa O2). W rozdziale „Materiały i metody" wskazane byłoby podanie informacji o uzyskaniu zgody Komisji Bioetycznej na przeprowadzenie

badania, tym bardziej, że dawcy próbek krwi podpisywali świadomą zgodę na udział w badaniu. W rozdziale „Materiały i metody" opisano szczegółowo technikę ozonowania krwi podając informację, że końcowe stężenie ozonu w próbkach krwi wynosiło 15 i 30 μg/ml odpowiednio dla grupy O1 i O2. Wyżej wymienione stężenia ozonu nie są spójne ze stężeniami podawanymi w rozdziale „Wyniki", które wynosiły 30 i 60 μg/ml odpowiednio dla grupy O1 i O2. Powyższe rozbieżności wymagają wyjaśnienia. Ilość mikrocząstek na μl w badanej próbce była wyliczana ze wzoru zamieszczonego na str. 28 w rozdziale „Materiały i metody", wskazane byłoby podanie źródła, z którego cytowany wzór pochodzi.

W rozdziale „Wyniki" Doktorant przedstawił wyniki przeprowadzonych analiz statystycznych przy pomocy 21 rycin. Odnośnie wpływu ozonowania krwi pełnej na wybrane parametry układu hemostazy zaobserwowano statystycznie istotny wzrost stężenia D-dimerów w porównaniu do grupy kontrolnej (grupa K) oraz grupy poddawanej działaniu powietrza atmosferycznego (grupa P). Wydłużenie APTT w obu grupach poddanych działaniu ozonu w porównaniu z grupą K oraz grupą P było statystycznie istotne, aczkolwiek niewielkie, nie wykraczające poza zakres normy. Wydłużenie PT osiągnęło istotność statystyczną tylko w grupie poddanej działaniu ozonu w dawce 60 μg/ml (grupa O2) w porównaniu z grupą K, grupą P oraz grupą ozonowaną dawką 30 μg/ml (grupa O1). Odnotowano znaczący statystyczne spadek stężenia fibrynogenu w grupie poddanej działaniu ozonu w grupie O1 oraz grupie O2 w porównaniu z grupą K oraz grupą P. Spadek stężenia fibrynogenu w grupie O2 w porównaniu z grupą O1 był również istotny statystycznie. W tym miejscu cenna byłaby informacje nt. wartości średnich oraz odchyleń standardowych dla badanych parametrów, gdyż z rycin nie można w łatwy sposób odczytać tych informacji. Nie podano również w tekście zakresu normy dla poszczególnych parametrów układu hemostazy, co utrudnia interpretację, czy wydłużone czasy APTT i PT obserwowane w ozonowanych próbkach wykraczają poza prawidłowy zakres. Co prawda ze zdania na str. 48 rozdziału „Dyskusja" można przeczytać, że „zmienione wartości APTT, PT i fibrynogenu" mieściły się w granicach normy, ale dla przejrzystości wyników informacja ta powinna być podana również w rozdziale „Wyniki". Wydaje się, że przy zastosowaniu czasu PT, badania wpływu ozonowania na wskaźnik INR nie dodaje nowych informacji w pracy, tym bardziej, że żaden ze zdrowych ochotników nie przyjmował pochodnych warfaryny.

W dalszej części rozdziału przedstawione wyniki dotyczą również oceny wpływu ozonowania krwi pełnej na ilość mikrocząstek. W obu ozonowanych grupach w porównaniu z grupą K oraz grupą P wykazano znamienny statystyczne wzrost ilości PMP oraz EMP. Różnica w ilości PMP i EMP w grupie O2 w porównaniu z grupą O1 była również istotna

statystycznie. W obu grupach poddanych działaniu ozonu oraz w grupie P odnotowano istotny statystyczne wzrost ilości ŚMP oraz LMP w porównaniu z grupą K. Ponadto wzrost ilości ŚMP w grupie O2 w porównaniu z grupą P również był istotny statystycznie, podobnie jak wzrost ilości LMP w grupach O1 i O2 w porównaniu z grupą P. Różnica w ilości LMP pomiędzy grupą O1 a grupą O2 też była istotne statystycznie. Wykazano ponadto, że wzrost ilości mikrocząstek generowanych z komórek krwi i śródbłonka jest wprost proporcjonalny od dawki ozonu oraz wykazano dodatnie korelacje pomiędzy ilościami poszczególnych mikrocząstek. Te nowatorskie obserwacje niewątpliwie wzbogaciłyby dodatkowe ryciny prezentujące wyniki odczytu mikrocząstek poszczególnych rodzajów w reprezentatywnych próbkach metodą cytometrii przepływowej wykorzystanej w badaniu. Interpretację uzyskanych wyników ułatwiłyby również precyzyjne informacje, na przykład w formie tabeli, opisujące wartości średnie wraz z odchyleniami standardowymi dla poszczególnych rodzajów mikrocząstek, gdyż z przedstawionych rycin trudno jest te wartości odczytać.

Uzyskane wyniki własne Doktorant omawia w „Dyskusji" w kontekście wyników opublikowanych przez innych Autorów. Podkreśla równocześnie, że w przeprowadzonych badaniach nie udało się wykazać statystycznie istotnej korelacji pomiędzy markerami układu hemostazy oraz ilością mikrocząstek, a jedną z przyczyn tego faktu może być zbyt mała liczebność badanych grup.

Na zakończenie Doktorant przedstawił 5 wniosków. O ile wnioski od 2 do 4 są odpowiednio udokumentowane wynikami, o tyle wniosek nr. 1 mówiący o tym, że ozonowania krwi pełnej hamuje krzepnięcie krwi i aktywuje fibrynolizę jest wnioskiem wykraczającym poza uzyskane wyniki. Doktorant wykazał jedynie, że w warunkach *ex vivo* ozonowania pełnej krwi wpływa na wyższe wartości APTT, PT, fibrynogenu i D-dimerów w porównaniu z próbkami kontrolnymi czy poddanymi napowietrzaniu, ale według informacji podanych w „Dyskusji" wartości w/w parametrów nadal pozostawały w granicach normy. Aby wykazać rzeczywisty wpływ ozonowania na hamowanie układu krzepnięcia i aktywację fibrynolizy należałoby potwierdzić jego wpływ również w warunkach *in vivo* po przetoczeniu pacjentowi ozonowanej krwi. Dlatego też w opinii recenzenta wniosek nr. 1 wymaga przeredagowania przed publikacją uzyskanych wyników.

Po analizie rozprawy doktorskiej lek. Piotra Olbromskiego za najważniejsze osiągnięcie Doktoranta uważam wykazanie, że ozonowanie krwi pełnej zwiększa ilość generowanych z komórek krwi i śródbłonka mikrocząstek, która jest wprost proporcjonalna do dawki ozonu. Zwiększenie uwalniania mikrocząstek może potencjalnie zwiększać ryzyko powikłań sercowo-naczyniowych i zapalnych u pacjenta. Z drugiej jednak strony ozonowanie

może wpływać korzystnie na utlenowanie tkanek i zmniejszenie stresu oksydacyjnego. Niezwykle istotny może być również potencjalny wpływ ozonowania na układ hemostazy u pacjenta, co może być interesującym, dalszym kierunkiem badań.

Podsumowując pozytywnie oceniam przedstawioną rozprawę doktorską. Doktorant zrealizował założone cele pracy. Praca zawiera aspekt poznawczy i może stanowi podstawę do dalszych badań.

Mam zaszczyt przedstawić Wysokiej Radzie Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku recenzję pracy i prosić Wysoką Radę o dopuszczenie lek. Piotra Olbromskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Prof. dr hab. n. med.
EWA [illegible]-MARANDA
specjalista chorób wewnętrznych
7050472