UNIWERSYTET MEDYCZNY
IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH WE WROCŁAWIU
Wydział Lekarski, Katedra i Zakład Chemii i Immunochemii
Dr hab. Magdalena Orczyk-Pawiłowicz

Ocena rozprawy doktorskiej
Pani lek. dent. Ireny Daniszewskiej
pt.: „Parametry stresu oksydacyjnego w tkance gruczołów ślinowych w przebiegu eksperymentalnej cukrzycy typu 1”

Cukrzyca typu 1 - przewlekła choroba o podłożu autoimmunologicznym, dotyka około 10 % procent wszystkich przypadków zaburzeń gospodarki węglowodanowej i stanowi istotny problem medyczny, społeczny i ekonomiczny. W przebiegu cukrzycy typu 1 obserwuje się zaburzenia funkcji wielu narządów i gruczołów, w tym gruczołów ślinowych. Ponadto, cukrzyca jest istotnym czynnikiem ryzyka wzrostu zapadalności na próchnicę i choroby przyzębia, stanów zapalnych w obrębie jamy ustnej, w tym zmian nieżytowych i grzybiczych, przerostu brodawek nitkowatych, zmniejszonego wydzielanie śliny i powiązanych z tym pogorszeniem naturalnego procesu oczyszczania jamy ustnej. Pacjenci z cukrzycą powinni więc być objęci szczególną i troskliwa opieką ze strony lekarza stomatologa. W ostatnich latach coraz większe znaczenie w patologii gruczołów ślinowych w cukrzycy insulinozależnej przypisuje się reaktywnym formom tlenu oraz zjawisku stresu oksydacyjnego.

Ocena formalna

Przedstawiona do oceny praca doktorska Pani lek. dent. Ireny Daniszewskiej posiada typowy układ i zawiera wszystkie niezbędne elementy wymagane od rozprawy doktorskiej. Dysertacja obejmuje 152 strony komputeropisu, zawierające 7 rycin i 46 tabel, a także wykaz skrótów użytych w pracy, streszczenia w języku polskim i angielskim. Przegląd piśmiennictwa jest bardzo aktualny, pracę napisano cytując 159 pozycji odpowiednio dobranego piśmiennictwa, w tym prawie 60% stanowią prace z ostatnich 10 lat i aż 20% cytowanych prac zostało opublikowanych w ostatnich 3 latach; ponad 91% piśmiennictwa to prace anglojęzyczne. Praca napisana jest starannie, wszystkie cytowane pozycje są zebrane w spisie piśmiennictwa.

Temat ocenianej rozprawy doktorskiej jest wartościowy zarówno w aspekcie poznawczym, jak i praktycznym/klinicznym. Tytuł dysertacji „Parametry stresu oksydacyjnego w tkance gruczołów ślinowych w przebiegu eksperymentalnej cukrzycy typu 1” odpowiada założeniom i treści pracy. We wstępie Autorka w sposób zwięzły, ale rzeczowy i nawiązujący bezpośrednio do przedmiotu badań, dokonuje przeglądu aktualnego stanu

wiedzy dotyczącego cukrzycy, stresu oksydacyjnego, ze szczególnym uwzględnieniem źródła wolnych rodników, osłabienia bariery antyoksydacyjnej, mechanizmów obrony antyoksydacyjnej, wpływu wolnych rodników na strukturę białek, lipidów i DNA oraz w bardzo skondensowanej formie charakterystykę gruczołów ślinowych szczura. W warunkach fizjologicznych, w organizmie istnieje stan równowagi pomiędzy działaniem reaktywnych form tlenu a biologiczną zdolnością do szybkiej detoksykacji reaktywnych produktów pośrednich lub naprawy wyrządzonych szkód. W przebiegu cukrzycy dochodzi do zaburzeń równowagi na skutek powstawania nadtlenków i wolnych rodników, powodujących oksydacyjne uszkodzenia wszystkich składników komórki.

Ocena merytoryczna

Pani lek. dent. Irena Daniszewska cele pracy sformułowała w sposób jasny i precyzyjny w postaci sześciu punktów, w których wytyczyła etapy swojej pracy doświadczalnej, tj. ocenę parametrów stresu oksydacyjnego w tkance gruczołów ślinowych w przebiegu eksperymentalnej cukrzycy typu 1 indukowanej streptozotocyną (streptozotocyna jest selektywnie toksyczna w stosunku do komórek β wysp trzustki). Do zadań tych należała: (1) ocena występowania i nasilenia oksydacyjnych uszkodzeń gruczołów ślinowych szczurów, mierzonego stężeniem grup karbonylowych, 8-izoprostanów, adduktów 4HNE z białkami, oxyLDL/MDA, 8-OHdG, OSI w dwóch okresach cukrzycy indukowanej streptozotocyną, (2) porównanie oksydacyjnych uszkodzeń i zaburzenia równowagi redox między gruczołem przyusznym a podżuchwowym oraz (3) ocena funkcji wydzielniczej gruczołów ślinowych szczurów w dwóch okresach cukrzycy indukowanej streptozotocyną. Na podstawie uzyskanych danych kolejnym celem pracy była odpowiedź na pytania: (4) czy istnieje związek pomiędzy badanymi parametrami stresu oksydacyjnego mierzonymi w surowicy krwi a mierzonymi w gruczołach ślinowych szczurów, (5) czy istnieje związek pomiędzy badanymi parametrami stresu oksydacyjnego w gruczołach ślinowych szczurów a funkcją wydzielniczą gruczołów ślinowych oraz (6) czy istnieje związek pomiędzy hiperglikemią a oksydacyjnym uszkodzeniem gruczołów ślinowych w dwóch okresach eksperymentalnej cukrzycy?

Materiał do badań opisano starannie i wyczerpująco. Badania przeprowadzono na modelu zwierzęcym, tj. 6 tygodniowych samcach szczurów rasy Wistar, po uzyskaniu zgody właściwej Komisji Etycznej do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach UMB. W mojej opinii część doświadczalna, tj. sposób indukcji cukrzycy w grupie badanej: wybór czynnika i odpowiedniej dawki oraz dobór grup: kontrolnej i badanej nie budzą wątpliwości.

Na uwagę zasługuje różnorodność zastosowanych technik oznaczeń, tj. pomiar wydzielania śliny (stymulowany i niestymulowany), oznaczenia parametrów w surowicy (stężenie glukozy, insuliny, wolnych kwasów tłuszczowych oraz pH) oraz w płynie nadosadowym z zastosowaniem metod kolorymetrycznych oraz immunoenzymatycznych testów fazy stałej (tzw. testy „kanapkowe” i konkurencyjne).

Dobór metod do oznaczeń biochemicznych takich jak: stężanie białka całkowitego, grup karbonylowych, adduktów 4-HNE z białkami, 8-isoP, oxy-LDL/MDA, 8-OHdG w płynie

nadosadowym z ślinianek oraz zastosowanie nieparametrycznych testów w analizie statystycznej do oceny różnic zmiennych ilościowych (test Kruskala-Wallisa) oraz zależności pomiędzy dwoma zmiennymi ilościowymi (współczynnik korelacji Spearmana) są prawidłowe. Indeks stresu oksydacyjnego (OSI) wyrażono stosunkiem: całkowitego statusu oksydacyjnego (TOS) do całkowitej zdolności antyoksydacyjnej (TAS).

Przedstawienie wyników nie zawiera typowego dla rozpraw doktorskich układu z wyodrębnieniem podrozdziałów, nie ma to jednak istotnego wpływu na klarowność prezentowanych wyników. Omówienie wyników badań zyskuje dzięki zamieszczeniu czytelnych, dobrze zaplanowanych 45 tabel, stanowiących uzupełnienie rozdziału Wyniki i ułatwiających orientację w dużej ilości zgromadzonych danych oraz w identyfikacji rezultatów wykazujących istotność statystyczną. Stwierdzam, że wszystkie zadania badawcze Doktorantka zrealizowała i przeanalizowała bardzo starannie.

Dyskusja została poprowadzona w sposób kompetentny i dojrzały. Doktorantka rzetelnie i obszernie skonfrontowała wyniki uzyskane w badaniach własnych z najnowszymi doniesieniami o zbliżonej tematyce innych badaczy z ośrodków krajowych i światowych, wykazała się doskonałą znajomością piśmiennictwa oraz umiejętnością właściwej oceny uzyskanych wyników. Doktorantka krytycznie odnosi się do wyników badań i wskazuje na możliwe ograniczenia eksperymentu takie jak model zwierzęcy, dawka streptozotocyny, czas trwania doświadczenia i ocena niektórych tylko, aczkolwiek najczęściej używanych markerów stresu oksydacyjnego. Ponadto, zwraca uwagę na możliwy toksyczny wpływ samej streptozotocyny na gruczoły ślinowe, który jak dotąd nie został określony na podstawie badań morfologicznych.

Doktorantka sformułowała sześć wniosków, które wynikają z przeprowadzonych analiz biochemicznych/statystycznych i stanowią satysfakcjonującą odpowiedź na postawione cele pracy. Doktorantka wykazała, że (1) zjawisko stresu oksydacyjnego nasila się wraz z czasem trwania eksperymentalnej cukrzycy, przy czym (2) większe zaburzenia równowagi redox i różnorodności oksydacyjnych modyfikacji obserwuje się w gruczole przyusznym vs. podżuchwowy bez względu na czas trwania choroby, (3) bez względu na etap cukrzycy indukowanej streptozotocyną, dochodzi do zaburzeń funkcjonowania obu ślinianek, czego wyrazem jest istotne obniżenie całkowitego stężenia białka. Ponadto, (4) wykazała brak zależności między markerami stresu oksydacyjnego w surowicy i gruczołach ślinowych, co sugeruje, że nasilenie oksydacyjnych modyfikacji jest wynikiem patologicznych procesów toczących się w gruczołach ślinowych, niezależnie od ogólnoustrojowego stresu oksydacyjnego.

Uwagi krytyczne

Doktorantka nie uniknęła drobnych błędów: nomenklaturowych („*glikolowanych LDL*" str. 20, powinno być glikowanych LDL; „*suplementacja endogennymi antyoksydantami*" str. 119, powinno być suplementacja egzogennymi antyoksydantami), nazewnictwa chemicznego, zwłaszcza nazw dla form rodnikowych, niezręczności stylistycznych (np. „*mediana niestymulowanego wydzielania śliny"* str. 138), stwierdzeń o znamionach skrótów

myślowych (np. *„cukrzyca nie jest choroba nieuleczalną"* str. 15), oraz drobnych uchybień edycyjnych, tj. dla niektórych skrótów podano nazwy jedynie w języku polskim, brak oznaczeń dla wszystkich omawianych form wolnorodnikowych. Ponadto, brak opisu metody oznaczania stężenia wolnych kwasów tłuszczowych (FFA), a dla stężenia glukozy jest błąd w wartości stężenia lub podanej jednostce str. 52 (w dyskusji jest poprawnie), rys. 3 w mojej opinii powinien być wykonany w większym rozmiarze oraz zawierać pełny opis w języku polskim, w opisie procesu utleniania DNA jest tymidyna, a na rys. 5 jest guanina, podpis pod rys. 5 jest prawidłowy. W spisie treści, w punkcie 2 numeracja jest nieprawidłowa, w podrozdziale Wstępu – „Stres oksydacyjny" są rozbieżności między opisem a podanym skrótem dla form rodnikowych; ponadto dla Tabel 2-18 opis powinien znajdować się pod tabelą, tak jak dla Tabel 19-46.

Pragnę podkreślić, że moje uwagi, jako recenzenta, nie umniejszają ogólnej pozytywnej oceny omawianej pracy.

Wniosek końcowy

Podsumowując ocenę rozprawy doktorskiej Pani lek. dent. Ireny Daniszewskiej stwierdzam, że praca stanowi oryginalne i wartościowe osiągnięcie wnoszące nowe elementy poszerzające aktualny stan wiedzy dot. udziału reaktywnych form tlenu oraz zjawiska stresu oksydacyjnego w patologii gruczołów ślinowych w cukrzycy insulinozależnej oraz przekładające się na kontynuowanie tego nurtu badawczego. Zadania badawcze Doktorantka zrealizowała i starannie przeanalizowała, wyciągnęła właściwe wnioski oraz krytycznie ustosunkowała się do własnych wyników w kontekście prac innych autorów.

Omawiana rozprawa doktorska wyczerpuje w pełni warunki stawiane rozprawom na stopień doktora określone w art. 13 ust.1 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, poz. 595, z późn. zm.). W związku z powyższym zwracam się do Wysokiej Rady Wydziału Lekarskiego z Oddziałem Stomatologii i Oddziałem Nauczania w Języku Angielskim Uniwersytety Medycznego w Białymstoku o dopuszczenie lek. dent. Ireny Daniszewskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie, biorąc pod uwagę aktualność tematu i wartość merytoryczną rozprawy, składam wniosek o wyróżnienie pracy nagrodą.

Wrocław, 08.12.2016 r

M. Orczyk-Pawiłowicz