



KATEDRA I ZAKŁAD PATOFIZJOLOGII
Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego
60-806 Poznań, ul. Rokietnicka 8
Tel. (48)(61)85476-24 (85476-20 - sekretariat)
Dr hab. n med. Katarzyna Korybalska, prof. UM
E-mail: koryb@ump.edu.pl

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Lek. Urszuli Kołodziej pt. „Produkty utleniania DNA, białek i lipidów w gruczołach ślinowych szczurów karmionych dietą bogatobiałkową i bogatotłuszczową”

Promotor: Dr hab. n. med. Anna Zalewska

Stosowanie w obecnych czasach różnorodnych rodzajów diet, zwłaszcza diet eliminacyjnych opartych na spożywaniu jednej grupy składników odżywczych, skłania naukowców do oceny ich skutków zdrowotnych. Nie zawsze kompleksowe i wnikliwe badania są możliwe u ludzi, dlatego wykorzystanie modelu zwierzęcego jest dobrą metodą uzyskiwania wiarygodnych wyników. W tym kontekście wybór tematu przez Doktorantkę uważam za bardzo trafny i ważny z klinicznego punktu widzenia.

Rozprawa doktorska lek. Urszuli Kołodziej pt. „Produkty utleniania DNA, białek i lipidów w gruczołach ślinowych szczurów karmionych dietą bogatobiałkową i bogatotłuszczową” jest pracą składającą się z cyklu monotematycznych trzech publikacji, z czego jedna z nich to praca przeglądowa, a dwie to prace oryginalne. Dysertacja liczy 83 strony i składa się z: wykazu publikacji stanowiących rozprawę doktorską (1 strona), podsumowania dorobku naukowego (1 strona), wykazu stosowanych skrótów i oznaczeń (3 strony), wstępu (9 stron), omówienia prac składających się na rozprawę doktorską (9 stron), streszczenia w języku polskim i angielskim (4 strony), publikacji stanowiących rozprawę doktorską (33 strony), 76 pozycji piśmiennictwa wymienionego według kolejności cytowań w tekście oraz informacje o charakterze udziału współautorów w publikacjach wraz z procentowym określeniem ich wkładu w powstanie pracy (16 stron). Dokumentacja zawiera zgodne

oświadczenia współautorów osiągnięcia naukowego, z których wynika, że dzielają oni opinię o dominującym udziale Doktorantki w procesie powstawania publikacji.

Wprowadzenie

Rozdział zawiera istotne informacje dotyczące zarówno pozytywnej jak i negatywnej roli, jaką odgrywa tlen. Autorka zwraca uwagę na różnorodne formy powstawania reaktywnych form tlenu (RFT) oraz opisuje ich negatywny wpływ na funkcjonowanie komórki podczas stresu oksydacyjnego, gdzie dochodzi do peroksydacji białek, lipidów oraz DNA. Warty podkreślenia jest fakt, że doktorantka nie zapomina o tym, że RFT w są również istotne dla wielu procesów fizjologicznych jak aktywacja czynników transkrypcyjnych aktywujących geny, wpływają na proliferację, apoptozę czy uczestniczą w eliminowaniu bakterii. Rozdział zawiera również obszerne informacje dotyczące antyoksydacyjnej ochrony naszego organizmu przed RFT (SOD, katalaza, peroksydaza glutationowa), uwzględniając ochronę antyoksydacyjną obecną w ślinie (peroksydaza ślinowa, kwas moczowy). Ślina to bardzo ważna miejscowa bariera ochronna przed wieloma niekorzystnymi składnikami obecnymi w naszej diecie.

Rozdział jest przejrzysty i zwięźle napisany wprowadzając czytelnika w tematykę zagadnienia, która w sposób bardziej szczegółowy została przedstawiona w pierwszej pracy cyklu publikacji zatytułowanej „Oxidative stress-repair systems of oxidatively damaged biomolecules” (Progress in Health Sciences, 2018; MNiSW 6). Publikacja w sposób bardzo wnikliwy przedstawia następujące zagadnienia: (i) powstawanie reaktywnych form tlenu implikujących stres oksydacyjny, (ii) oksydacyjne zmiany pojawiające się w białkach, lipidach oraz DNA, (iii) różnorodne systemy naprawy oksydacyjnych zmian, pojawiających się w białkach, lipidach oraz kwasach nukleinowych.

Omówienie prac składających się na rozprawę doktorską

Ten fragment pracy doktorskiej przedstawia w sposób skrótowy, z uwzględnieniem metodyki, wyników i uzyskanych wniosków, dwóch prac doświadczalnych będących częścią dysertacji. Pierwsza publikacja zatytułowana jest „Oxidative modification in the salivary glands of high fat-diet induced insulin resistant rats” (Frontiers in Physiology, 2017; IF 4,134, MNiSW 35), druga nosi tytuł „Chronic

high-protein diet induces oxidative stress and alters the salivary gland function in rats" (Archives of Oral Biology, 2017; IF 1,748, MNiSW 30).

Szczegółowe omówienie istoty publikacji:

1. Oxidative modification in the salivary glands of high fat-diet induced insulin resistant rats" (Frontiers in Physiology, 2017; IF 4,134, MNiSW 35),
2. „Chronic high-protein diet induces oxidative stress and alters the salivary gland function in rats" (Archives of Oral Biology, 2017; IF 1,748, MNiSW 30).

Obydwie prace mają bardzo podobny schemat badawczy. Doktorantka wykorzystują do badań samce szczurów rasy Wistar (grupy po 8 zwierząt). Zwierzęta przez okres 8 tygodni były karmione specjalnie wyselekcjonowanymi paszami. W przypadku publikacji pierwszej jest to pasza bogatotłuszczowa o prawie sześciokrotnie wyższej zawartości tłuszczu, niż pasza stosowana przez zwierzęta w grupie kontrolnej. W przypadku publikacji drugiej zwierzęta karmiono paszą bogatobiałkową o dwukrotnie wyższej zawartości białka w porównaniu z grupą kontrolną. Po zakończeniu eksperymentu od zwierząt pobrano następujący materiał biologiczny: (i) ślinę stymulowaną (stymulant: pilokarpina podana dootrzewnowo) oraz niestymulowaną, (ii) krew z żyły ogonowej do oceny glikemii, (iii) krew z tętnicy brzusznej, (iv) ślinianki podżuchwowe i przyuszne prawe do badań biochemicznych oraz lewe do badań histopatologicznych. W publikacji pierwszej testującej dietę bogatotłuszczową oceniono w surowicy stężenie wolnych kwasów tłuszczowych (FFA), insulinę oraz wskaźnik insuliooporności HOMA-IR. W surowicy oraz supernatancie ślinianek podżuchwowych i przyusznych oceniono parametry stresu oksydacyjnego lipidów (4-HNE, 8-isoP), białek (PC, AOPP) oraz DNA (8-OHdG). W eksperymencie wykorzystującym dietę bogatobiałkową w tym samym materiale biologicznym oceniono parametry istotne dla ochrony przed RFT takie jak aktywność peroksydazy, katalazy, dysmutazy ponadtlenkowej (SOD), stężenie kwasu moczowego, całkowitą zdolność antyoksydacyjną (TAS) oraz całkowitą zdolność oksydacyjną (TOS). W obydwu pracach wykonano również preparaty histopatologiczne ze ślinianek i po wybarwieniu ich hematoksyliną i eozyną oceniano mikroskopowo.

Celem przeprowadzonych badań była:

- ocena bariery antyoksydacyjnej gruczołów ślinowych (publikacja druga)

- ocena występowania oksydacyjnych modyfikacji białek, tłuszczu oraz DNA we krwi oraz homogenatach ślinianek (publikacja pierwsza i druga)
- ocena wydzielania śliny stymulowanej oraz niestymulowanej (publikacja pierwsza i druga)
- ocena wzajemnych korelacji pomiędzy analizowanymi parametrami stresu oksydacyjnego w surowicy i mierzonymi w homogenatach ślinianek (publikacja pierwsza i druga)

Wyniki przeprowadzonych badań zostały przedstawione w formie tabel, rycin oraz zdjęć preparatów histologicznych ślinianek podżuchwowych, przyuszných po zastosowaniu odpowiedniej diety oraz odpowiadające im grupy kontroln. Wartości w tabelach oraz na rycinach przedstawiają medianę wraz z wartościami minimalnymi i maksymalnymi, co sugeruje nieparametryczny rozkład danych.

Z przeprowadzonych badań wynikają następujące wnioski:

- Zarówno dieta bogatotłuszczowa jak i bogatobiałkowa skutkuje pojawieniem się oznak stresu oksydacyjnego w śliniankach. Intensywność tych zmian w poszczególnych śliniankach zależy od rodzaju diety.
- Intensywność stresu oksydacyjnego wywołanego dietą bogatotłuszczową jest bardziej widoczna w śliniankach przyuszných, natomiast diety bogatotłuszczowej w śliniankach podżuchwowych.
- Spośród wielu przeanalizowanych markerów stresu oksydacyjnego tylko wzrost markerów peroksydacji lipidów (4HNE, 8isoP) we krwi i homogenatach ślinianek przyuszných pojawia się zarówno po diecie bogatotłuszczowej jak i bogatobiałkowej.
- Obydwe diety zmieniają zdolności sekrecyjne ślinianek. Dieta bogatotłuszczowa zmniejsza stymulowaną produkcję śliny, zaś dieta bogatobiałkowa zmniejsza produkcję niestymulowanej śliny.
- Dieta bogatobiałkowa w większym stopniu stymuluje barierę antyoksydacyjną w w śliniankach przyuszných niż podżuchwowych (wzrost Px, kwasu moczowego, TAS).
- Dieta bogatotłuszczowa, stosowana przez 8 tygodni, spowodowała wzrost glikemii, insuliny, FFA oraz doprowadziła do pojawienie się insulinooporności mierzonej wskaźnikiem HOMA-IR.

- Obydwie testowane diety zmieniają obraz morfologiczny ślinianek skutkując nadmierną wakuolizacją.
- Nie stwierdzono korelacji pomiędzy badanymi parametrami w surowicy i supernatancie ślinianek.

Po uważnej lekturze tej monografii szczególnie doceniam:

- Wyczerpujące przedstawienie tematyki stresu oksydacyjnego, przedstawione w pracy przeglądowej („Oxidative stress-repair systems of oxidatively damaged biomolecules”).
- Logiczny plan eksperymentów.
- Przejrzyste udokumentowanie wyników.
- Bardzo wnikliwe przedyskutowanie uzyskanych wyników.
- Za wyjątkowo ważne uważam, stwierdzenie tłumaczące implikacje insulinooporności w odpowiedzi na dietę bogatą w tłuszcze. Insulinooporność prowadzi do zmian funkcjonowania ślinianek w obrębie jamy ustnej, sprzyjając próchnicy i chorobom przyzębia.

Trudno wskazywać na niedociągnięcia w publikacjach oryginalnych. Obydwie analizowane prace, zostały opublikowane w czasopiśmie z listy filadelfijskiej, jedna ze szczególnie wysokim IF - 4,134, co oznacza, że środowisko naukowe uznało je za wartościowe. Tym niemniej recenzent pozwoli sobie na drobne uwagi:

- Zmiany pojawiające się pomiędzy śliniankami w obydwu dietach byłyby łatwiejsze do zauważenia dla czytelnika, gdyby wyniki tych samych parametrów ocenianych w homogenacie ślinianek przyuszných i podżuchwowych były zamieszczone obok siebie. Taka forma przedstawienia wyników pozwala na pokazanie wielu istotnych statystycznie wyników w różnych konfiguracjach.
- Szkoda, że w publikacji pierwszej oceniającej wpływ diety bogatotłuszczowej nie oceniono parametrów bariery antyoksydacyjnej, tak jak to miało miejsce przy ocenie diety bogatobiałkowej.
- Pewną niezręcznością językową jest stosowanie sformułowania płyn nadosadowy. W literaturze polskiej powszechnie funkcjonuje sformułowanie zapożyczone z języka angielskiego – supernatant.
- Nie zgadzam się z ostatnim wnioskiem pojawiającym się w obydwu publikacjach, który informuje, że nie stwierdzono korelacji pomiędzy markerami stresu oksydacyjnego w surowicy i śliniankach, co dowodzi, że uszkodzenie oksydacyjne

w gruczołach ślinowych w odpowiedzi na testowane diety powstaje niezależnie od ogólnoustrojowego stresu oksydacyjnego. Ocena korelacji dla małej grupy jest bardzo mało precyzyjna. Tego rodzaju korelacje nie pojawiają się nawet przy większej liczbie danych (np. korelacja krew-ślina). Na odpowiedź ślinianek ma z pewnością bardzo duży wpływ miejscowe działania diety. Drogą krwi docierają do nich również składniki ocenianej diety i różnorodne czynniki biologiczne, które pojawiły się we krwi w odpowiedzi na nieprawidłowe karmienie szczurów. Odpowiedź ślinianek to wypadkowa miejscowego i systemowego oddziaływania testowanej diety.

Podsumowanie recenzji

Doktorantka w dysertacji przedstawiła wpływ diety bogatotłuszczowej i bogatobiałkowej na ślinianki podżuchwowe i przyuszne szczurów rasy Wistar, które pozostawały na testowanej diecie przez okres 8 tygodni. Podjęcie tego rodzaju badań jest ważne tym bardziej, że dobrze funkcjonujące ślinianki to bardzo ważna miejscowa bariera produkująca substancje zapobiegające przed niekorzystnymi składnikami diety, chroniąc jamę ustną przed próchnicą i chorobami przyzębia. Praca jest dobrze zaplanowana i udokumentowana licznymi badaniami biochemicznymi oraz histopatologicznymi. Najważniejszym wnioskiem wypływającym z badań jest stwierdzenie, że obie diety implikują stres oksydacyjny, prowadzącego do zmian sekrecyjnych, biochemicznych i morfologicznych w śliniankach.

Wniosek końcowy

Całość rozprawy doktorskiej, wskazuje na dobre opanowanie warsztatu naukowego przez Autorkę. Przedstawioną pracę oceniam bardzo dobrze. Dobry plan oraz szeroki zakres wykonanych badań sprawia, że stworzony model badawczy *in vivo* dalej może być rozwijany i wykorzystywany w ocenie wpływu innych wyselekcjonowanych składników diety. Reasumując praca doktorska lek. Urszuli Kołodziej spełnia kryteria stawiane dysertacji doktorskiej na stopień doktora nauk medycznych. Doktorantka w przedstawionych pracach udowodniła swoją dojrzałość naukową. Jest badaczem umiejącym zaplanować badania, i stosownie je skomentować. We właściwy sposób dochodzi do ważnych konkluzji. Ze względu na

jej bardzo ważny aspekt poznawczy uważam, że praca doktorska zasługuje na wyróżnienie.

Na podstawie dokonanej powyżej pozytywnej oceny, zwracam się do Pana Dziekana Wydziału Nauk o Zdrowiu Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku o przedłożenie Radzie Wydziału wniosku o dopuszczenie Kandydatki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Poznań, 16.08.2018

Katarzyna Korybalska

UNIWERSYTET MEDYCZNY
im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu
Katedra i Zakład Patofizjologii
60-806 Poznań, ul. Rokietnicka 8
tel./fax 61 854 76 20

Dr hab.
Katarzyna Korybalska