

Warszawa, 7 lipca 2017 r.

Prof. Jan Pachecka

Katedra Biochemii i Chemii Klinicznej

Wydział Farmaceutyczny WUM

Recenzja

pracy doktorskiej pt. „Kinureniny a biomechanika i geometria kości w przewlekłej chorobie nerek u szczura” wykonanej przez mgr Bartłomieja Grzegorza Kałaska pod kierunkiem Prof. dr hab. Dariusza Pawlaka w Zakładzie Farmakodynamiki Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku

Oceniana praca doktorska jest kontynuacją wieloletnich badań prowadzonych w Zakładzie Farmakodynamiki Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku dotyczących konsekwencji fizjologicznych i biochemicznych przewlekłej niewydolności nerek.

Wiodącym celem badań wchodzących w zakres recenzowanej pracy doktorskiej finansowanej przez Narodowe Centrum Nauki (projekt badawczy Preludium nr: 2015/19/N/NZ4?01347 pt. „Produkty degradacji tryptofanu szlakiem kinureninowym, a biomechanika i metabolizm kości w przewlekłej chorobie nerek”) było określenie relacji pomiędzy aktywnymi biologicznie produktami katabolizmu tryptofanu powstającymi w szlaku kinureninowym, kinureniną i 3-hydroksykinureniną (3HK) a geometrią oraz biomechaniką kości w zwierzęcym modelu przewlekłej choroby nerek (PChN).

Tak sformułowany cel rozprawy doktorskiej stanowi nowe podejście do zagadnienia etiopatogenezy osteoporozy towarzyszącej przewlekłej chorobie nerek. Podejście to jest oparte na danych literaturowych dotyczących roli kinureniny i jej metabolitów w patogenezie tego stanu patologicznego oraz na dotychczasowych badaniach prowadzonych przez zespół Prof. Dariusza Pawlaka realizowanych m.in. w ramach projektu pt. „Powiązania układu serotonina-leptyna z metabolizmem kostnym w doświadczalnej niewydolności nerek u szczura”.

Doktorant, powołując się na Ustawę z dnia 15 stycznia 2015 roku o ochronie zwierząt, do badań laboratoryjnych wchodzących w zakres pracy doktorskiej wykorzystał materiał biologiczny (surowica, kości, mózg) uzyskany w ramach innego projektu realizowanego przez zespół badawczy Zakładu zgodnie z obowiązującymi procedurami i wytycznymi, po uzyskaniu zgody Lokalnej Komisji Etycznej do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach.

Przedstawiony w części doświadczalnej pracy schemat przebiegu eksperymentu biologicznego w sposób obrazowy przedstawia logiczny ciąg postępowania, od momentu wprowadzenia zwierząt do eksperymentu (czterotygodniowe szczury, samce rasy Wistar, 15 zwierząt w grupie kontrolnej, 18 zwierząt w grupie badanej) do etapu pobrania materiału do badań, który był następnie przechowywany w temperaturze -80°C do czasu wykonania dalszych badań. W tekście pracy nie znalazłem informacji jak długo materiał biologiczny był przechowywany w stanie zamrożenia do wykonania oznaczeń analitycznych oraz czy realny czas przechowywania próbek biologicznych w stanie zamrożenia nie miał wpływu na wartość oznaczanych parametrów biochemicznych. Stopień niewydolności nerek wywołany przy użyciu modelu subtotalnej nefrektomii oceniano przez pomiar stężenia kreatyniny i mocznika w surowicy krwi przy użyciu komercyjnych zestawów diagnostycznych. Oceny gospodarki wapniowo fosforanowej dokonano przez oznaczenie stężenia wapnia, fosforu nieorganicznego oraz parathormonu w surowicy krwi przy użyciu prawidłowo dobranych metod analitycznych. Ocenę obrotu kostnego przeprowadzono w oparciu o pomiar aktywności fosfatazy alkalicznej (marker kościotworzenia) oraz izoenzymu 5b winianoopornej fosfatazy kwaśnej (marker resorpcji kostnej) przy użyciu testów komercyjnych. Wybór markerów biochemicznych oraz metod ich oznaczania uważam za prawidłowy.

Oceny właściwości biomechanicznych kości piszczelowej w badaniach wytrzymałościowych dokonano zgodnie z procedurami opisanymi w literaturze przy użyciu zintegrowanego zestawu Zwick Roell Z.2.5 wyposażonego w oprogramowanie testXpert II.

Oceny właściwości geometrycznych, gęstości mineralnej oraz analizy histologicznej kości dokonano przy użyciu metod konwencjonalnych.

Stężenie tryptofanu, kinureniny i 3-hydroksykinureniny w surowicy i mózgu szczurów oznaczano przy użyciu techniki wysokosprawnej chromatografii cieczowej przy użyciu metod opisanych w literaturze.

Badania ekspresji genów receptora węglowodorów aromatycznych (AhR) oraz izoenzymu CYP1A1 cytochromu P-450 w kości piszczelowej wykonano techniką PCR (RT-PCR) zgodnie z procedurą opisaną w maszynopisie pracy w sposób pozwalający na odtworzenie warunków postępowania analitycznego.

Oceny statystycznej uzyskanych wyników dokonano przy wykorzystaniu prawidłowo dobranych testów i oprogramowań statystycznych.

Maszynopis ocenianej rozprawy doktorskiej zawiera typowe dla tego typu opracowań części merytoryczne: Przegląd literatury dotyczącej tematu rozprawy. Cel pracy. Część doświadczalna. Wyniki. Dyskusja. Wnioski. Streszczenie. Streszczenie w języku angielskim. Piśmiennictwo. Ponadto maszynopis pracy zawiera: Wykaz stosowanych skrótów. Wykaz tabel. Wykaz rycin. Wykaz wzorów.

Część zatytułowana „Przegląd literatury” zawiera dobrze wyselekcjonowane informacje dotyczące przewlekłej choroby nerek, zaburzeń mineralno-kostnych w przebiegu przewlekłej choroby nerek z uwzględnieniem patofizjologii i badań diagnostycznych tego stanu patologicznego, budowy, funkcji i procesu przebudowy kości. Tę część pracy kończy podrozdział poświęcony omówieniu szlaku kinureninowego, w którym Autor rozprawy omawia przebieg, znaczenie i zaburzenia tego szlaku metabolizmu tryptofanu. Doktorant

zwraca naleŹną uwagę na intermediaty szlaku kinureninowego w tym kinureninę i 3-hydroksykinureninę, których stęŹenie rośnie w przewlekłej chorobie nerek.

Ta część pracy jednoznacznie wskazuje, Źe Autor rozprawy bardzo dobrze zapoznał się z literaturą przedmiotu oraz Źe posiada umiejętność przedstawienia racjonalnych przesłanek uzasadniających trafność podjęcia problematyki badawczej stanowiącej podstawę ocenianej rozprawy doktorskiej.

Cel pracy został sformułowany prawidłowo w oparciu o aktualny stan wiedzy i wyniki dotychczasowych prac zespołu badawczego. Uzyskane przez Doktoranta rezultaty, przeprowadzona analiza i dyskusja wyników oraz sformułowane wnioski upowaŹniają do stwierdzenia, Źe mgr B. Kałaska osiągnął zamierzony cel badań.

Następny fragment pracy zatytułowany „Część doświadczalna” zawiera istotne informacje dotyczące warunków prowadzenia doświadczeń na zwierzętach zgodnych z Dyrektywą Parlamentu Europejskiego i Rady Europy z 2010 roku, schemat przebiegu eksperymentu, opis modelu subtotalnej nefrektomii oraz podstawowe informacje dotyczące metodyki oznaczania parametrów biochemicznych, oceny właściwości biomechanicznych kości piszczelowej w badaniach wytrzymałościowych, oceny gęstości mineralnej kości, analizy histologicznej kości piszczelowej, warunków oznaczania stęŹenia tryptofanu, kinureiny i 3-hydroksykinureнины w surowicy krwi i mózgu, oceny ekspresji genów receptora węglowodorów aromatycznych i cytochromu P4501A1. Przedstawione informacje wskazują, Źe stosowane w pracy metody zostały wybrane i opisane w sposób prawidłowy. Stosowane w pracy metody pozwalają na osiągnięcie zamierzonego celu badań.

Część pracy zatytułowana „Wyniki” zawiera prezentację rezultatów przeprowadzonych badań przedstawionych w formie 7 tabel i 9 rycin. Sposób przedstawienia wyników badań uważam za prawidłowy i czytelny. Tytuły oraz opisy tabel i rycin zawierają wszystkie informacje opisujące w wystarczający sposób warunki prowadzenia poszczególnych oznaczeń i prezentacji wyników badań. Wyniki zostały pogrupowane prawidłowo w sekwencji następujących grup tematycznych: charakterystyka zwierząt, charakterystyka kości w oparciu o parametry biomechaniczne, geometryczne i gęstość mineralną mierzoną metodą Archimedesesa, analiza histologiczna kości, ocena zmian stęŹenia tryptofanu, kinureнины i 3-hydroksykinureнины w surowicy, ocena ekspresji genów receptora węglowodorów aromatycznych i cytochromu P4501A1, ocena zmian stęŹenia tryptofanu, kinureнины i 3-hydroksykinureнины w mózgu. Przedstawienie wyników badań wieńczy podrozdział zatytułowany analiza korelacji pomiędzy stęŹeniem tryptofanu, kinureнины i 3-hydroksykinureнины w mózgu a parametrami biochemicznymi, geometrycznymi i gęstością mineralną kości u szczurów w grupie badawczej. Uważam, Źe Doktorant prawidłowo przedstawił i omówił wyniki uzyskanych badań.

Bardzo dobrze napisana jest również następna część pracy zatytułowana „Dyskusja”, w której Doktorant dokonał konfrontacji wyników badań własnych z rezultatami uzyskanymi w macierzystym Zakładzie oraz innych ośrodkach naukowych zarówno w badaniach eksperymentalnych na zwierzętach jak również w badaniach klinicznych. Sposób napisania tej części pracy dobrze świadczy o umiejętności prowadzenia dyskusji naukowej oraz dojrzałości badawczej Autora recenzowanej rozprawy doktorskiej.

Na zakończenie dyskusji Doktorant formułuje sugestię, że metabolity szlaku kinureninowego mają działania pleiotropowe, zależnie od miejsca syntezy mogą one odgrywać pewną rolę w rozwoju zaburzeń mineralno-kostnych w przebiegu przewlekłej choroby nerek.

Na podstawie badań własnych, prawidłowo dokonanej analizy wyników oraz twórczej dyskusji Doktorant sformułował 5 wniosków wskazujących, po pierwsze, stopień uszkodzenia nerek w zwierzęcym modelu PChN determinuje wzrost stężenia kinurenin i obniżenie poziomu tryptofanu w mózgu i surowicy krwi szczurów, po drugie, intensywny wzrost młodych zwierząt może przeciwdziałać szkodliwym następstwom PChN, po trzecie, aktywacja obwodowego układu kinureninowego w PChN może negatywnie wpływać na wytrzymałość kości, po czwarte, wysokie stężenie kinurenin może powodować patologiczne zmiany w strukturze kości poprzez aktywację układu zależnego od receptora węglowodorów aromatycznych, po piąte, dwa niezależne układy kinureninowe, ośrodkowy oraz obwodowy, wywierają heterogenny wpływ na układ kostny, przy czym aktywacji ośrodkowych przemian kinurenin towarzyszy nasilenie procesów kościotworzenia, a obwodowy wzrost stężenia kinurenin wykazuje efekt przeciwny w stosowanym modelu doświadczalnym. Uważam, że przedstawione przez Doktoranta wnioski są adekwatne do uzyskanych wyników.

Streszczenie pracy w języku polskim i angielskim są napisane dobrze. Zawierają wszystkie najważniejsze informacje dotyczące problematyki, metodyki badawczej, uzyskanych wyników, wniosków oraz sugestii dotyczących znaczenia przeprowadzonych badań.

Wykaz piśmiennictwa zawarty na stronach 68-81 zawiera 159 dobrze wybranych pozycji literatury opublikowanych głównie w latach 2000-2017. W wykazie piśmiennictwa znajdują się również prace źródłowe opublikowane w latach 1950, 1972, 1976.

Recenzowaną pracę oceniam pozytywnie. Praca dostarcza nowych informacji pozwalających na lepsze zrozumienie roli metabolitów szlaku kinureninowego w rozwoju zaburzeń mineralno-kostnych w przebiegu przewlekłej choroby nerek, a w perspektywie dalszych badań, na podjęcie wstępnych prób opracowania strategii postępowania w diagnostyce, profilaktyce i terapii tego stanu patologicznego.

Uważam, że recenzowana praca spełnia ustawowe warunki stawiane rozprawom na stopień doktora nauk farmaceutycznych dlatego zwracam się do Wysokiej Rady Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku o dopuszczenie mgr Bartłomieja Grzegorza Kałaska do kolejnego etapu przewodu doktorskiego


Prof. dr hab. Jan Pachecka