

Recenzja rozprawy doktorskiej lekarza Krzysztofa Wróbla

pt. „Zmienność wybranych wskaźników fizjologicznych osocza krwi na modelu mysim zjawiska analgezji, generowana alkoholem etylowym”.

Praca została wykonana pod kierunkiem Pani dr hab. Bożeny Witek, profesora UJK w Kielcach. Badania zostały przeprowadzone na 48 samcach 8-tygodniowych myszy linii Swiss-Webster pochodzących z Instytutu Genetyki i Hodowli Zwierząt Polskiej Akademii Nauk w Jastrzębcu k/ Warszawy. W ośrodku tym od ponad 30 lat prowadzona jest selekcja myszy w kierunku wysokiej (HA) i niskiej (LA) analgezji postresowej. Eksperyment Doktoranta trwał 21dni, projekt eksperymentu uzyskał zgodę Komisji Bioetyki działającej przy Świętokrzyskiej Izbie Lekarskiej w Kielcach w 2014 roku.

Przedstawiona do recenzji dysertacja ma układ standardowy. Maszynopis rozprawy, napisanej w języku polskim, liczy 182 stron tekstu z wkomponowanymi tabelami (31) i rycinami (23). Zagadnienia związane z tematem zostały w sposób prawidłowy uporządkowane i fachowo omówione w siedmiu głównych rozdziałach podzielonych na podrozdziały.

Rozdział zatytułowany **Wstęp** liczy 57 stron wydruku komputerowego i składa się z **sześciu** podrozdziałów. Na ośmiu stronach **pierwszego jego podrozdziału** scharakteryzowane zostały fizyczno-chemiczne i biologiczne właściwości etanolu, jego metabolizm na czterech szlakach jego przemian wraz z ich lokalizacją, omówiono również neurotoksyczny wpływ oddziaływania alkoholu na ośrodkowy i obwodowy układ nerwowy. Autor w sposób trafny i rzeczowy wpisuje się do dyskusji na temat czy uzależnianie od alkoholu jest chorobą czy nie. Odnosi się również do wpływu alkoholu na organizm w aspekcie toksycznym. Objaśnia, iż destrukcyjny wpływ etanolu na organizm ujawnia się po każdej ilości spożycia, bowiem dochodzi do stresu oksydacyjnego związanego z pojawieniem się jego biochemicznych metabolitów w wyniku jego przemian. Oczywiście, siła niszcząca alkoholu jest proporcjonalna do ilości spożytego alkoholu. Z punktu mojej wiedzy reklama o umiarkowanym piciu alkoholu, jako „sposobu zapobiegania chorobom serca” związana jest z celami komercyjnym a nie wynika z badań naukowych. Dlatego w pełni popieram stanowisko Światowej Organizacji Zdrowia, która zaleca całkowitą abstynencję. Stoi bowiem na stanowisku, że nawet umiarkowane picie nie jest dobre dla zachowania dobrego zdrowia i sprawności umysłowej. Od XVI wieku historia dokumentuje wykorzystywanie alkoholu do otrzymywania nalewek, wyciągów i ekstraktów z surowców roślinnych. Roztwory te stosowano wewnątrz i zewnątrz, niektóre z nich, właśnie celem zmniejszenia dolegliwości bólowych.

Powszechna opinia, że wrażliwość na ból jest kwestią tylko i wyłącznie naszych predyspozycji genetycznych okazuje się być błędna. Naukowcy z londyńskiego King's College obalili tę tezę poprzez badania przeprowadzone na parach bliźniąt. Okazało się, że

istnieje możliwość modyfikowania odporności na ból. Koniec XVIII i początek XIX wieku zapisały się odkryciem substancji chemicznych, które dokonały zasadniczego przełomu w walce z cierpieniem ludzkim, zwłaszcza podczas wykonywania zabiegów operacyjnych. Zwrócono uwagę na gaz rozwesalający, chloroform, eter oraz alkohol. Dlatego alkohol można uznać za pierwotny i powszechny analgetyk, tak jak Doktorant uważa i jednocześnie podkreśla, że ten fakt był dla Niego inspiracją do pojęcia badań w tym kierunku.

Drugi jedenastostronicowy podrozdział jest skoncentrowany na zjawisku bólu, na czynnikach go wywołujących w tym substancjach chemicznych tzw. bólorodnych, receptorach czucia bólu i mechanizmach jego ujawniania. Doktorant podaje pewnej krytyce definicję bólu zaproponowaną w 1979 roku przez Międzynarodowe Towarzystwo Badania Bólu twierdząc, że zjawisko bólu nie jest precyzyjnie zinterpretowane jako fenomen fizjologiczny. Mnogość prowadzonych badań przybliży nas do poznania tajemnicy bólu i pozwoli, w oparciu o nowe fakty naukowe, zdefiniować ten fenomen fizjologiczny. Doktorant koncentruje się na podłożu biochemicznym bólu i słusznie, bowiem reakcje stresowe są związane nie tylko pobudzeniem informatycznym ale i również energetycznym.

Krótki (dwustronny) **trzeci podrozdział** poświęcony jest selekcji. Autor nawiązuje do selekcji naturalnej oraz selekcji rozumianej jako wybór zwierząt o określonych cechach rozrodu, którego skutkiem jest zmiana frekwencji alleli i genotypów w następnych pokoleniach. Jednym z takich rodzajów kierunkowej selekcji okazała się selekcja zaprogramowana w celu zwiększenia i zmniejszenia wrażliwości bólowej jako fenotypowej cechy typowo fizjologicznej. Jej skutkom poświęcona została tematyka pracy Doktoranta.

Czwarty podrozdział został podzielony na siedem podpodrozdziałów, bowiem tyle wskaźników metabolicznych w osoczu krwi było analizowanych przez Autora. Wybrano albuminy, białko całkowite, bilirubinę, cholesterol oraz glukozę, kreatyninę i triacyloglicerole. Analizowano również frakcje cholesterolu LDL i HDL. Ustosunkowano się każdorazowo do domniemywanej celowości pomiaru określonego parametru.

Autor badał w osoczu także aktywność ośmiu enzymów. W **piątym podrozdziale** scharakteryzowano wybrane enzymy pod kątem ich roli w metabolizmie komórkowym, narządowym niezbędnym do prawidłowego funkcjonowania organizmu, podano konsekwencje zdrowotne uwarunkowane ich niedoborem.

Ostatni **podrozdział (szósty)** wstępu, zatytułowany „**Elektrolity osocza krwi**” został poświęcony makroelementom takim jak: fosfor, wapń, magnez, chlor, potas, sód, które pełnią wiele zadań w organizmie, a ich niedobory mogą wiązać się nie tylko z przewlekłym osłabieniem, ale przede wszystkim z bardzo poważnymi problemami zdrowotnymi. Również zakłócenie gospodarki żelaza może mieć poważne skutki zdrowotne. Stwierdzono, że alkohol może generować pewien regulacyjny system na osi hepcydyna-ferroportyna doprowadzający do nadmiernej absorpcji żelaza z przyjmowanego pokarmu, co skutkuje dużą jego kumulacją w wątrobie. Wydaje się, że w przyszłości badanie powiązań między obiegiem żelaza hemowego i jonowego może być skutecznym sposobem na powiększenie wiedzy o

molekularne podstawy homeostazy żelaza. Słuszną decyzją Doktoranta było również pochylenie nad badaniem stężenia mleczanu w osoczu. Doktorant cytuje najnowszą publikację Ferguson i wsp. z 2018, w której autorzy odnoszą się do metabolizmu mleczanu w kontekście historycznych błędów interpretacyjnych i przedstawiają uzasadnienie współczesnego podejścia do jego roli w organizmie.

Wstęp jest wartościowym wprowadzeniem do zagadnień sformułowanych w temacie pracy. Część teoretyczna prezentuje skondensowaną i przejrzystą formę informacji pozwalającą przeprowadzić czytającego przez kolejne zagadnienia związane z wynikami i ich interpretacją.

Rozdział 2. -2 strony- Cel i założenia pracy. W tej części Autor odniósł się do wrażliwości bólowej w kontekście medycyny, wyjaśnia, że badanie różnic na bodźce bólowe u człowieka jest złożone ze względu na wielość czynników jakie mają wpływ na to zjawisko. Poza tym prowadzone z udziałem ludzi badania sugerują, że w odczuwaniu bólu często w większym stopniu decydują czynniki psychologiczne, a ich potencjał bywa silniejszy niż czynniki somatyczne. Natomiast w badaniach na zwierzętach można pominąć aspekt psychologiczny i rozpatrywać wyłącznie osobnicze różnice, decydujące o wrażliwości bólowej. Dlatego Doktorant wybrał model myszy do realizacji celu pracy, polegający na pozyskaniu mysiego modelu analgezji w postaci dwóch genetycznych linii myszy HA (*high analgesia*) i La (*low analgesia*). Celem pracy było ustalenie czy zróżnicowane drogą selekcji zwierzęta w kierunku wysokiej i niskiej analgezji będą różnić się stężeniem i aktywnością badanych wskaźników fizjologicznych w ich osoczu oraz czy reakcja w postaci ewentualnych zmian badanych wskaźników osoczu krwi zwierząt przyjmujących etanol będzie zróżnicowana w zależności od ich wrażliwości bólowej.

Rozdział 3. Materiały i metody (-7 stron-), zawiera dokładny opis przebiegu testowania myszy, toku eksperymentu oraz metod oznaczania wybranych fizjologicznych wskaźników w osoczu krwi w tym: dziewięciu metabolitów, ośmiu enzymów i ośmiu elektrolitów. Do poszczególnych metod analizy podano materiały źródłowe.

Analizę statystyczną uzyskanych wyników prowadzono przy wykorzystaniu programu statystycznego SPSS STATISTICS 24.

Rozdział 4. Zestawienie i omówienie wyników – przedstawiono na 31stronach, które zawiera 31 tabel w tym 23 z nich prezentuje dane w odniesieniu do pojedynczych badanych metabolitów, enzymów i elektrolitów. W trzech tabelach 24, 25, 26 podano odpowiednio zbiorcze zestawienia analizy wariancji dla metabolitów, enzymów i elektrolitów. W ostatnich pięciu tabelach (27-31) zestawiono wartości współczynników korelacji między wybranymi metabolitami, enzymami i elektrolitami. W tym rozdziale zamieszczono również 23 wykresy ze zmianami badanych parametrów w osoczu wyrażonych w procentach.

Przeprowadzona przez Doktoranta analiza statystyczna otrzymanych wyników charakteryzowała się w większości przypadków bardzo niską wartością poziomu istotności, mniejszą lub równą od $p \leq 0,01$, chociaż zwykle przejmuje się nawet wyższą wartość $p \leq$

0,05, która jest akceptowalną w badaniach. Wartość $p \leq 0,01$ o silnych dowodach, które upoważniają do odrzucenia hipotezy zerowej.

Z ośmiu przebadanych metabolitów, trzy z nich: albumina, białko całkowite, glukoza nie były zróżnicowane zarówno w obu liniach genetycznych HA i LA ale także alkohol nie zmienił ich istotnie istniejących relacji ilościowych. W odniesieniu do cholesterolu i jego frakcji (LDL i HDL) ujawniły się istotne różnice zarówno między grupami kontrolnymi myszy o wysokiej i niskiej analgezji, stwierdzono też różnice pomiędzy grupami myszy przyjmującymi etanol w grupie LA, natomiast różnice nie pojawiły się w grupie myszy HA. W przypadku obu frakcji cholesterolu HDL i LDL potwierdzono zróżnicowanie między myszami grup HA i LA, natomiast etanol nie wpływał na zmiany stężenia w obu tych frakcji ani w obrębie grupy HA ani grupy LA. Osobniki grupy genetycznej HA miały wyższe wartości kreatyniny wobec myszy z grupy genetycznej LA. Myszy grupy HA, którym podawano etanol wykazały podwyższenie stężenia kreatyniny wobec osobników kontrolnych tej grupy. Myszy HA charakteryzowały się niższym stężeniem triacylogliceroli wobec osobników grupy LA. Jednocześnie przyjmowany etanol spowodował wzrost stężenia TAG ale jedynie u osobników grupy HA. W grupie myszy LA nie ujawniły się pod tym względem statystyczne różnice.

Z ośmiu badanych aktywności enzymów dwa z nich, fosfataza alkaliczna i lipaza, nie wykazywały zróżnicowania aktywności na każdym badanym poziomie czyli zarówno wobec kontroli jak i wpływu alkoholu. Pozostałe enzymy aminotransferaza alaninowa i asparaginianowa, cholinesteraza, dehydrogenaza mleczanowa wykazały zróżnicowanie genetyczne między kontrolami. Pozostałe dwa enzymy gamma glutamylotransferaza oraz kinaza kreatynowa oprócz zróżnicowania kontroli HA i LA ujawniły dodatkowe zróżnicowanie. Kinaza kreatynowa w grupie myszy LA wykazała istotne zróżnicowanie tego enzymu, stwierdzono zmniejszenie jej aktywności w stosunku do wartości kontrolnych. Wielość zmian dla gamma glutamylotransferazy odnotowano w grupie HA, wpływ alkoholu spowodował zwiększenie aktywności natomiast w grupie LA podawanie etanolu skutkowało zmniejszeniem aktywności.

W ramach elektrolitów nie odnotowano zmian stężenia badanych jonów w ramach adekwatnych grup kontrolnych HA do LA również alkohol nie wpływał na ich wielkość w obu badanych grupach.

Analiza wariancji dla badanych metabolitów wskazała statystyczne różnice między grupami genetycznymi HA i LA w odniesieniu do bilirubiny i cholesterolu całkowitego z jego frakcji HDL i LDL, kreatyniny i triacylogliceroli. W przypadku kreatyniny i triacylogliceroli zróżnicowanie dotyczyło również wpływu etanolu w odniesieniu do poziomu kreatyniny i triacylogliceroli (grup K/A).

W odniesieniu do grupy badanych ośmiu enzymów sześć z nich wykazywało istotne statystyczne różnice między grupami. Nie stwierdzono tego efektu dla fosfatazy alkalicznej i lipazy.

Zbiornicze zestawienie analizy wariancji dla badanych elektrolitów osocza krwi nie wykazało istotnego zróżnicowania stężenia badanych elektrolitów między grupami genetycznymi i grupami osobników przyjmujących alkohol.

Kolejnym etapem było poszukiwanie wartości współczynników korelacji między wybranymi metabolitami, enzymami i elektrolitami (tabele 27-31). Wyliczone współczynniki korelacji między albuminą, bilirubiną, kreatyniną, glukozą i białkiem wskazały na istnienie związku tylko między bilirubiną i glukozą.

Wartość współczynników korelacji Pearsona między całkowitym stężeniem cholesterolu ze stężeniem jego frakcji HDL i LDL okazała się istotna. Również istotną okazała się wartość tego współczynnika dla HDL do LDL.

W ramach wartości współczynników korelacji r_{xy} dla aktywności enzymów osocza, w tym fosfatazy alkalicznej, aminotransferazy alaninowej, asparaginianowej i gamma glutamylotransferazy, wysokie wartości stwierdzono jedynie dla aminotransferazy alaninowej i asparaginianowej.

Wartości współczynników Pearsona dla wybranych metabolitów, enzymów i elektrolitów w tym cholinesterazy, kinazy kreatynowej, mleczanów, dehydrogenazy mleczanowej, lipazy (tabela 30) wskazują, że istotne okazały się zależności między kinazą kreatynową oraz dehydrogenazą mleczanową. Wykazano też ujemną korelację między aktywnością cholinesterazy a stężeniem mleczanów oraz aktywnością lipazy i kinazy kreatynowej.

Wartości współczynników korelacji r_{xy} między elektrolitami w osoczu krwi badanych myszy: wapń, chlor, żelazo, potas, magnez, sód, fosfor okazały się istotne między chlorem a magnezem, chlorem a sodem, żelazem a sodem oraz magnezem a fosforanami.

Piąty rozdział to Dyskusja wnikliwa licząca 30 - stron odnosząca się do 25 (9 metabolitów, +8 enzymów +8 elektrolitów) wybranych wskaźników osocza krwi. Mnogość stron dyskusji wynika nie tylko z ilości przebadanych składników osocza ale przede wszystkim z bardzo wnikliwej interpretacji ujawnionych jak i nie ujawnionych zmian ilościowych wynikających ze zróżnicowania stopnia analgezji i reakcji poalkoholowej. Doktorant bardzo skrupulatnie odnosi swoje wyniki do najnowszych danych literaturowych. Należy z całą mocą podkreślić, że w dyskusji Doktorant bardzo często powołuje się na publikacje z ostatnich dwóch lat, **stwierdziłam 35 pozycji**: Tapia-Rojas et al. 2017, Raghav i Ahmad 2018, Naldi et al. 2017, VerPlank, Goldberg 2017, Goldberg 2018, Fujiwara et al. 2017, Bowen i et al. 2018, Norris et al. 2018, Huynh-Do et al. 2018, Sondergaard et al. 2017, Niswender . et al. 2018, Ekici et al. 2018, Lee et al. 2018, Prado et al. 2017, Haarhaus 2017, Fodor et al. 2017, Pasala i Carmody 2017, Karpen 2017, Sheridan i Logomarsino 2017, Bækgaard, Nielsen et al. 2017, Suni et al. 2017, Tang 2017, Vallee et al. 2018, Ellison, Felker 2017 Schmidt, Peyronnet 2018, McDonough, Youn 2017, Hoorn Ellison 2017, Giorgi et al. 2018, Reid et al. 2017, Wimalawansa et al. 2017, Zaidi et al. 2018, Chandran et al. 2017, Peng i Uprichard 2017, Kunutsor 2017, Von Haehling et al. 2017, Rocha et al. 2018, Saru et al. 2017, Kolnagou et al. 2018.

Szósty rozdział to Uwagi ogólne, w moim odczuciu jest to dyskusja nad tematyką bólu. Doktorat twierdzi w oparciu o otrzymane wyniki i swoje przemyślenia, że ból jest zjawiskiem generującym zwiększone zapotrzebowanie energetyczne niezbędne dla realizacji przebiegu reakcji bólowej. Podzielim to stanowisko Doktoranta, również zgadzam się z tym, że ból jest zjawiskiem zakłócającym biochemiczną homeostazę organizmu wprowadzając go w stan stresowy. Jeżeli organizm nie potrafi opanować i zlikwidować reakcji stresowej jako odpowiedzi na urazowe uszkodzenie, może nastąpić jego wyczerpanie. Należy mieć jednak na uwadze fakt, że ból ma też pozytywną stronę bowiem ostrzega, kiedy coś złego dzieje się w organizmie.

Odnoszę wrażenie, że wybrany temat przez Doktorantkę, był zgodny z Jego zainteresowaniami, wiedzą i umiejętnościami, bowiem potwierdził we wstępie w dyskusji i uwagach ogólnych, że lubi poszukiwać, zestawiać i analizować. Z całym przekonaniem stwierdzam, że Biochemia kliniczna dla lekarza stomatologii Krzysztofa Wróbla jest pasją naukową. W pracy naukowej liczy się pasja, ponieważ ona skutkuje efektywnością w pracy badacza.

Po rozdziale Dyskusja, Doktorant formuje **8 wniosków**. Wnioski te są stawiane na podstawie uzyskanych wyników. Należy dodać, że każdy z wniosków znajduje swoje odzwierciedlenie w przedstawionych wynikach i koresponduje z zadaniami cząstkowymi zawartymi w Celu i założeniu pracy. Mam pytanie: czy wysunięte wnioski szczegółowe pozwalają na sformułowanie wniosku „ogólnego” – zwanego również wnioskiem nadrzędnym? Doktorant w swej dysertacji korzystał z ponad 400 pozycji literaturowych w większości anglojęzycznych. W spisie literatury znalazły się pozycje publikowane począwszy od lat osiemdziesiątych ubiegłego wieku (a nawet wcześniejsze prace klasyczne) aż po najnowsze z ostatnich lat. Zebrane źródła obejmują problemowo całokształt podjętego tematu związanego z bólem, analgezyją i rolą etanolu w tych procesach. Ten bogaty i wszechstronny wybór piśmiennictwa pozwala czytelnikowi na usystematyzowanie wiedzy nim przejdzie do części wynikowej.

Liczebność pozycji literaturowych nie powinno zmuszać Autora do powiększania ilości przez **duplikację źródeł**, pozycji (strona 174 Witek B. Kołataj A. 2012).

Rozprawa jest zakończona streszczeniem w języku polskim i angielskim.

W podsumowaniu pragnę podkreślić ogrom włożonej przez Doktoranta pracy w przygotowanie Rozprawy. Uzyskane wyniki są unikalne i wartościowe, ciekawie zinterpretowane pod kątem ich znaczenia ilościowego, jakościowego oraz przydatności w ewentualnej terapii.

Z wielką przyjemnością wnioskuję również do Rady Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi o wyróżnienie pracy lekarza Krzysztofa Wróbla, ponieważ cechuje ją:

- aktualność tematyki związanej z procesem bólu i zjawiskiem analgezji,

- przedstawione argumenty, w pełni uzasadniają celowość podjętych badań,
- merytoryczny sposób przeprowadzenia badań,
- trafność interpretacji uzyskanych wyników na tle bogatego i aktualnego piśmiennictwa naukowego.
- poprawność języka naukowego.

Pozwolę sobie jeszcze stwierdzić, iż w mojej opinii lekarz Krzysztof Wróbel posiada ugruntowaną wiedzę i przygotowanie zawodowe pozwalające mu prowadzić projekty z zakresu Biochemii Klinicznej.

Reasumując stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji praca spełnia wszystkie warunki stawiane rozprawom doktorskim określone w art.13 Ustawy o stopniach i tytułach naukowych z dnia 14 marca 2003 roku i wnoszę o dopuszczenie rozprawy doktorskiej przygotowanej przez lekarza stomatologii Krzysztofa Wróbla do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Stawiam jednocześnie wniosek o wyróżnienie rozprawy doktorskiej przez Radę Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi.

Z. Dziurawski

Gliwice, dnia 12.07.2018