

Katowice, 22.07.2014 r.

## OCENA

**rozprawy doktorskiej lekarza *Roksany Dorantowicz* z Kliniki Chorób Wewnętrznych i Farmakologii Klinicznej Wydziału Wojskowo-Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi zatytułowanej: „*Rola melatoniny w patogenezie miażdżycy – wpływ na śródbłonek, remodeling naczyniowy i lokalną odpowiedź immunologiczną*”.**

Układ rozprawy doktorskiej zawierającej 132 stron jest typowy i składa się z przejrzystego spisu treści, sześciostronicowego wykazu skrótów, spisu rycin i tabel, wstępu, wyodrębnionych założeń pracy, celów pracy, hipotez, opisu metodyki i zastosowanych procedur doświadczalnych, wyników wzbogaconych dokumentacją tabelaryczną oraz czytelnymi wykresami, jak również dyskusji podzielonej na rozdziały, a podsumowanej wnioskami. Co warte podkreślenia, w ostatnim punkcie dyskusji Autorka opisuje kierunki planowanych dalszych badań, co niewątpliwie świadczy o chęci kontynuowania oraz dodatkowego wzbogacenia dotychczas uzyskanych rezultatów. Końcowymi punktami dysertacji są: piśmiennictwo oraz streszczenie w języku polski i angielskim. W treści rozprawy Autorka powołuje się na 220 pozycji aktualnego piśmiennictwa. Ponadto rozprawa zawiera 25 niezwykle czytelnych, wydrukowanych w kolorze rycin, które niejednokrotnie są rozbudowane o kilka podpunktów, pracę wzbogaca również 15 przejrzystych tabel. Całość uzupełniają fotografie analizatora systemu xCELLigence oraz fotografie bezpośrednich wyników uzyskanych z cytometru przepływowego.

Głównym zagadnieniem stanowiącym fundament dysertacji jest próba oceny przez Autorkę roli melatoniny w patogenezie miażdżycy ocenianej w aspekcie: a) funkcji komórek śródbłonna naczyniowego tworzących swoistego rodzaju barierę (tzw. barierowość), b) przebudowy ściany naczyniowej (tzw. *remodeling*) oraz c) miejscowej odpowiedzi immunologicznej (czyli odpornościowej). Doktorantka we wstępie definiuje powyższe zagadnienia w sposób syntetyczny i wystarczający dla potrzeb dalszych analiz, choć wg gustu Recenzenta rzeczony zagadnienia mogłyby być opisane nieco bardziej szczegółowo. Na przykład udział monocytów/makrofagów w patogenezie miażdżycy, która jest przecież tytułem niniejszej rozprawy, został potraktowany po macoszemu, zwłaszcza w ujęciu roli makrofagów aktywowanych klasycznie oraz alternatywnie (przeciwzapalnie). Oczywiście w standardowej publikacji naukowej aktualny rozmiar będzie wystarczający, jednak w przypadku rozprawy



doktorskiej winien być ujęty nieco szerzej. Wg subiektywnego odczucia Recenzenta akapit dotyczący fraktalkiny również mógł zostać opisany nieco szerzej. Chemokina ta (której *nota bene* największa ekspresja ma miejsce w mózgu) poprzez receptor CX3CR1 aktywuje TACE (*TNF-alfa converting enzyme*), odpowiadając tym samym za swoiste wyciszanie odpowiedzi zapalnej komórek posiadających ten receptor, a biorących udział w tworzeniu blaszki miażdżycowej. Fraktalkina hamuje także ekspresję IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IL-6 oraz wolnych rodników tlenowych, a jej ekspresja zmniejsza się wraz z wiekiem człowieka, co niewątpliwie może mieć związek z częstszym występowaniem chorób stanowiących powikłania miażdżycy.

Kolejnego niewielkiego poczucia niedosytu Recenzent doznał w trakcie analizy rozdziału opisującego melatoninę. Na przykład niewiele w nim wspomniano o podkreślanej w najnowszym piśmiennictwie roli jądrowych receptorów należących do rodziny RZR/ROR, które w efektach działania melatoniny odgrywają pewną rolę. Co ciekawe, ich ewentualny udział w obserwowanych przez Autorkę wynikach badań nie został (w dyskusji) wzięty pod uwagę. Recenzenta niezmiernie natomiast zafrapował fakt występowania skórnych fotoreceptorów w okolicy podkolanowej (u ludzi?) i z czystej ciekawości prosiłby Autorkę o kilka słów przybliżających tę anatomiczną, dość zadziwiającą strukturę. Autorka podaje również fizjologiczne surowicze stężenia melatoniny występujące w ludzkim organizmie, ale dokonuje tego w pg/ml, czym niewątpliwie naraża Recenzenta na stres związany z przeliczaniem ww. jednostek na te, które Autorka stosuje następnie na dalszych etapach badania (czyli M). Recenzent z niemałym trudem dokonał takich przeliczeń i stwierdził, że fizjologiczne stężenia rzeczonego hormonu u człowieka mieszczą się w granicach kilkudziesięciu do kilkuset pM. Zatem stężenia zastosowane w doświadczeniu (czyli nM i  $\mu$ M) są o kilka rzędów wielkości większe niż te, które występują w fizjologii. W badaniach *in vitro* nie jest to oczywiście błędem, jednakowoż Recenzent prosiłby Autorkę o kilka słów dyskusji wyjaśniającej ograniczenia wnioskowania wynikające z zastosowania takich stężeń w aspekcie ogólnej patogenezy miażdżycy, o której mowa przecież w tytule pracy. W dysertacji nie znaleziono również surowiczego stężenia 7K występującego u ludzi.

Nadmienienia wymaga fakt, że sformułowane uwagi mają jedynie sprowokować Autorkę do niewielkiej dyskusji i oczywiście nie zaprzeczają wysokiej, merytorycznej wartości przedstawionej pracy. Co więcej, Autorka nie unika w niej skomplikowanych i śmiałych rozważań z kręgu biochemii komórki, co świadczy o Jej szerokiej wiedzy i naukowym doświadczeniu. Graficzne zapisy reakcji oraz schematy przemian niewątpliwie ułatwiają czytelnikowi orientację w meandrach wstępnych rozważań Autorki. Wreszcie, co jest zupełnie zgodne z logiką wywodu, Recenzent znajduje wyczerpujące i rzeczowe omówienia, a co

najważniejsze, podparte najświeższymi opublikowanymi danymi.

W oparciu o aktualny stan wiedzy Autorka formułuje wyczerpujące założenia pracy, które po części oparte są na wstępnie przeprowadzonych przez Nią doświadczeniach. Cele wydają się być określone precyzyjnie, a hipotezy postawione logicznie i rzeczowo. Doktorantka umiejętnie i syntetycznie przedstawia materiały i metody, którymi posłużyła się badając założone cele. W tym jednak miejscu Recenzent pragnąłby zapytać Autorkę, w jaki sposób określiła stężenia zastosowanej w doświadczeniach melatoniny (być może na podstawie wcześniejszych badań pilotażowych lub na podstawie dostępnej literatury) oraz czy w hodowlach kontrolnych, czyli tych, które nie zawierały melatoniny ani 7-ketocholesterolu również znajdował się etanol, tak jak w wymienionych hodowlach badanych. Alkohol ten ma bowiem udowodnione działanie modulujące szereg procesów biochemicznych w komórkach, w tym procesów zapalnych i apoptycznych. Jako że Recenzent również zajmuje się pracą laboratoryjną prosiłby On Autorkę o opisanie, w jaki sposób były przeprowadzane procedury rozcieńczania substancji w warunkach sterylnych, ale w warunkach całkowitej ciemności, z uwagi na znaczną wrażliwość na światło i utlenianie roztworów melatoniny. Wydaje się bowiem, że praca z pipetą lub probówkami, przy braku oświetlenia, jest jednak dość utrudniona (str. 43).

Nad wyraz ciekawym zagadnieniem byłoby odniesienie uzyskanych wyników do rezultatów otrzymanych w hodowlach zawierających melatoninę, ale uprzednio inkubowanych z antagonistą receptorów melatoninowych (np. luzindolem). Taka szarsza interpretacja mogłaby nadać dodatkowy blask wnioskowaniu wynikającemu z ewentualnego działania pozareceptorowego, które jak dotąd nie zostało zbadane. Takie działanie mogłoby wynikać z agonizmu melatoniny w stosunku do wspomnianych uprzednio jądrowych receptorów RZR/ROR. Oczywiście poprzednie zdania proszę traktować jedynie jako podpowiedzi, a nie uwagi merytoryczne. Badania prowadzone przez Recenzenta, a polegające na narażaniu komórek w warunkach *in vitro* na różnego rodzaju leki pokazały, że szereg z nich działa niezgodnie z obowiązującymi teoriami farmakodynamicznymi, czyli często poza właściwymi sobie receptorami.

Wyniki dysertacji przedstawiono na 30 stronach, przeplatając tekst niezwykle czytelnymi rycinami, tabelami i fotografiami, co niewątpliwie znacznie ułatwiło ocenę obszernego materiału badawczego. Na pochwałę zasługuje skrupulatność i konsekwencja opisu uzyskanych wartości liczbowych z podaniem istotności statystycznej w prezentacjach graficznych. Język zastosowany w omówieniu wyników jest precyzyjny i nie zawiera żadnych skrótów myślowych ani fraz emocjonalnych. Recenzentowi brakuje natomiast przykładowych

fotografii hodowanych komórek, co niewątpliwie nadałoby wynikom pewnej przestrzennej plastyczności.

Przeprowadzona przez Doktorantkę dyskusja jest ostrożna i krytyczna, miejscami w odczuciu Recenzenta zbyt ścisła i syntetyczna, ale zawsze odnosi się do pedantycznie opisanych wyników. Kandydatka bardzo dobrze wiąże swoje obserwacje z obowiązującym w tym zakresie piśmiennictwem. Wykazuje świetną orientację w badanych zagadnieniach oraz umiejętność interpretacji skomplikowanych przecież wyników. Na szczególne uznanie zasługują akapity kończące większość podrozdziałów dyskusji, w których Autorka podkreśla pewnego rodzaju niedoskonałości metod oraz potrzeby przeprowadzenia kolejnych doświadczeń naukowych angażujących inny, bardziej rozbudowany warsztat badawczy. Te krytyczne uwagi zasługują na szczególną pochwałę, ponieważ ukazują rzadko spotykaną obecnie w młodym pokoleniu cechę, jaką jest samokrytycyzm. Umieszczone na stronie 106 kierunki dalszych badań również zasługują na uznanie.

Rozważania Autorki kończą jednoznacznie sformułowane wnioski, choć wydaje się, że w ich punkcie pierwszym należałoby dodać, iż 7-ketocholesterol jest substancją toksyczną w stężeniu badanym przez Autorkę. Aktualne brzmienie sugeruje toksyczność tej substancji w jakimkolwiek stężeniu, a tak przecież nie jest.

Z wolna reasumując Recenzent pragnie przytoczyć słowa chińskiego filozofa Konfucjusza, który miał w zwyczaju mawiać, że „*ludzie potykają się nie o góry, ale o kretowiska*”. Takimi kretowiskami, które w przedłożonej do oceny pracy nie pozwoliły Recenzentowi rozpedzić się i biec bez żadnego odpoczynku aż do końca manuskryptu są bardzo liczne błędy edytorskie. Na przykład: obecne na prawie każdej stronie podwójne spacje lub ich brak, spacje przed znakami interpunkcyjnymi, kropki przed kwadratowymi nawiasami (str. 100) oraz pojedyncze literówki (np. na str. 94: rak stuka zamiast rak sutka). Błędy te występują nawet w wytłuszczonych tytułach poszczególnych rozdziałów (str. 47). Jest to o tyle zadziwiające, że obecnie w zasadzie każdy komputerowy edytor tekstu sygnalizuje takie nieprawidłowości. I kolejną, ostatnią już, niewielką uwagę, którą Recenzent chciałby zamieścić, jest niezgodność z językiem polskim pewnych zastosowanych naukowych i badawczych terminów. Oczywiście swoista techniczna nowomowa jest w pewnych sytuacjach nieunikniona, jednak pamiętając o czystości języka ojczystego powinno się w dysertacji, o ile wszakże to możliwe, zastosować terminologię polską, nawet gdy wymaga ona nieco bardziej kwiecistych i rozbudowanych opisów. Następujące sformułowania szczególnie rozdrażniły Recenzenta: transmigracja, przy pomocy, inkorporacja, działania antyremodelingowe, działania barieroprotekcyjne, komórki zabramkowane, markery, spulowano i w końcu barierowość.

Warto zauważyć, że wszystkie te formy można zastąpić ładnymi polskimi frazami. Recenzent chce jednak podkreślić, że tego typu niedociągnięcia są dość trudne do uniknięcia zwłaszcza gdy tematyka jest hermetyczna, a otrzymane rezultaty zawile i niejednokrotnie niejednoznaczne. Natomiast wyszczególnione uwagi Recenzenta w żaden sposób nie mają na celu krytyki merytorycznej strony pracy, ani tym bardziej podważania wysokiej jej wartości, a wynikają jedynie z zadziornego charakteru Recenzenta.

W konkluzji Recenzent stwierdza, że przysłana Mu do oceny rozprawa doktorska pt: *Rola melatoniny w patogenezie miażdżycy – wpływ na śródbłonek, remodeling naczyniowy i lokalną odpowiedź immunologiczną*” została przeprowadzona rzeczowo i prawidłowo. Wnosi ona ważne i istotnie nowe informacje do badań fundamentalnych i w pewnym zakresie może dać podstawę do stawiania wniosków klinicznych. Stwierdza się również, że ww. praca spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim w świetle ustawy o tytułach i stopniach naukowych.

**Recenzent ma zatem zaszczyt i niewątpliwą przyjemność przedstawić Wysokiej Radzie Wydziału Wojskowo-Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi wniosek o dopuszczenie lekarza Roksany Dorantowicz do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

*dr hab. n. med. Krzysztof Labuzek*

dr hab. n. med. KRZYSZTOF LABUZEK  
specjalista chorób wewnętrznych  
specjalista farmakologii klinicznej  
DIABETOLOG  
43-600 Jaworzno, ul. Krakusa I  
tel. 701 067 376