

dr hab.med. Jan Stetkiewicz,

Recenzja pracy doktorskiej lek. **Tomasza Chlebego**

pt. „Wpływ kofeiny na rozwój surfaktantu w zarodku kurzym. Badania ultrastrukturalne”  
wykonanej pod kierunkiem Prof. dr hab.med. Hieronima Bartla

Niedobór surfaktantu jest najczęstszą przyczyną zespołu zaburzeń oddychania (ZZO) noworodków. Zespół ten obserwuje się w przypadkach wcześniactwa, ciężkich wad wrodzonych rzadziej wad metabolicznych lub chorób genetycznie uwarunkowanych. Ważnym czynnikiem wpływającym na dalszy rozwój dzieci jest niedotlenienie okołoporodowe. Tak więc czynniki stymulujące dojrzewanie nabłonka pęcherzyków płucnych, zwłaszcza pneumocytów II typu, jak również stymulujące przez te komórki produkcję surfaktantu. Tradycyjnie wśród populacji wiejskiej rodzące w trakcie porodu popijały "kompot z wódką". Wywoływało to działanie relaksacyjne, przyspieszało poród, jak również prawdopodobnie przyspieszało "dojrzewanie" pneumocytów II typu. Okazało się, iż w przypadkach porodów przedwczesnych (7 - 8 m. ciąży) zwiększało to szanse na przeżycie noworodków. Współczesne obserwacje doprowadziły, że kortykosterydy a wśród nich deksametazon podawany ciężarnym w okresie przed- lub okołoporodowym zasadniczo zapobiegają wystąpieniu ZZO (dawniej określanym zespołem błon szklistych), tj. zespołu związanego z niedoborem surfaktantu. Inne obserwacje wskazane przez Doktoranta wskazały, iż spożywanie przez ciężarne kawy lub podanie wcześniakom w pierwszych godzinach życia kofeiny może zmniejszać ryzyko pojawienia się ZZO. Tak więc podjęcie przez doktoranta problemu wpływu kofeiny na rozwój surfaktantu jest wysoce zasadne. Zasadniczo w diagnostyce ZZO oprócz badań klinicznych i RTG ocenia się niekiedy w popłuczynach OP stosunku lecytyny do sfingomieliny, poziomu fosfatydyloglicerolu i stosunku surfaktantu do albumin. Ale ocena wytwarzania surfaktantu w pneumocytach II typu jest bardzo istotne

Układ pracy jest typowy: wstęp, cel pracy, materiał, metody, wyniki, dyskusja, piśmiennictwo, streszczenia.

W bardzo obszernym wstępie obejmującym około 1/3 opracowani. Doktorant szczegółowo opisał budowę, metabolizm i farmakodynamikę kofeiny ze szczególnym uwzględnieniem jej działania na układ oddechowy. Następnie opisał budowę chemiczną i funkcje surfaktantu

oraz budowę płuc zwracając szczególnie uwagę na rolę surfaktantu w kształtowaniu prawidłowej budowy i czynności układu oddechowego.

Tę część doktoratu oceniam bardzo wysoko. Doktorant wykazał się dogłębną wiedzą w zakresie morfologii płuc oraz humoralnych i molekularnych mechanizmów związanych z rolą surfaktantu i ksenobiotyków (kofeiny i steroidów)..

Doktorant w oparciu o dane przedstawione we Wstępie wytyczył główny cel swojej pracy polegający na zbadanie wpływu wczesnego zastosowania kofeiny na rozwój układu oddechowego w modelu jaja kurzego. Dla osiągnięcia tego celu Doktorant zaplanował szereg celów pomocniczych polegających na:

1. Ocenie jakościowej i ilościowej ciał blaszkowatych zawartych w pneumocytach typu II.
2. Ocenie wydzielania surfaktantu poprzez pomiary zawartości fosfolipidów w ciałach blaszkowatych
3. Wykazanie zależności pomiędzy dawką kofeiny a wydzielaniem surfaktantu.
4. Porównanie wpływu znanego stymulatora rozwoju układu oddechowego (deksametazonu) z działaniem kofeiny.
5. Pośrednio- wykazanie zależności pomiędzy spożyciem kofeiny przez kobiety ciężarne a rozwojem układu oddechowego płodu.
6. Wskazanie na możliwy mechanizm działania metyloksantyn w leczeniu bezdechów w przebiegu dysplazji oskrzelowo-płucnej.

Model jaja kurzego stosowany był głównie do badań przesiewowych nad teratogennym działaniem ksenobiotyków. Zastosowanie tego modelu do oceny morfometrycznej czynności narządów pod wpływem ksenobiotyków jest unikalnym sposobem. Opisany przez Doktoranta sposób podawania testowanych substancji, inkubacji jaj oraz preparatyki po stadium uzyskania preparatów ultracienkich został szczegółowo przedstawiony i nie budzi zastrzeżeń. Przedstawione dobrej jakości elektronogramy wskazują, że stosowana metodyka dała możliwość uwidocznienia pneumocytów typu II i zawartych w nich struktur mielinowych odpowiadających surfaktantowi. (Należy mieć świadomość, iż lamelarny, elektronowogęsty charakter tych struktur jest artefaktem i wynika ze składu biochemicznego surfaktantu zawierającego fosfolipidy wiążące czterotlenek osmu, podobnie jak mielina w osłonkach włókna osiowego nerwów obwodowych). Uwidocznienie struktur mielinowych w cytoplazmie pneumocytów typu II dało możliwość morfometrycznej ich oceny. Stosując dość rygorystyczne kryteria przy zastosowaniu komputerowego analizatora obrazów oceniano:

1. Powierzchnię pneumocytów typu II; komórki
2. Sumaryczną powierzchnię ciałek blaszkowatych w pneumocycie typu II:

3. Średnia powierzchnia ciała blaszkowatego;
4. Powierzchnię jądra komórkowego i wyrażana w pikselach
5. Liczbę ciałek blaszkowatych-w pneumocycie typu II.  
dalsze parametru oceniane przez doktoranta dotyczyły:
6. Udziału ciałek w cytoplazmie (wskaźnik określający stosunek powierzchni ciałek blaszkowatych do bezjądrzastej powierzchni cytoplazmy.)
7. Współczynnik wypełnienia wyrażony jako powierzchnię struktur blaszkowatych do powierzchni tych ciałek.

Wyniki tych pomiarów Doktorant przedstawił w 8 tabelach zawierających wyniki indywidualnych pomiarów w poszczególnych grupach oraz porównawczo międzygrupowych istotnych parametrów (liczby ciałek i ich powierzchni oraz udziału ciałek w cytoplazmie i stopniu ich wypełnienia na 8 rycinach. Przedstawienie wyników pomiarów morfometrycznych z elektronogramów świadczy o dużej rzetelności Doktoranta z wykonanych przez niego badań ilościowych. Recenzent zajmujący się badaniami morfometrycznymi w patomorfologii odczuwa pewien niedosyt. w tabelach części wyniki nie uwzględniono standardowego odchylenia (co zapewne przeraziło Doktoranta), zazwyczaj w prezentacji wyników tych badań zamieszcza się standardowy błąd średniej. Komputerowy program STATGRAPH doskonale ilustruje ilościowe różnice międzygrupowe, jak również podstawowe parametry statystyczne (średnią ary metryczną, standardowe odchylenie, standardowy błąd średniej( ze wskazaniem istotnych różnic istotnych grupami. Sądzę, że należy uzupełnić metodykę badań statystycznych o dane dotyczące stosowanej metodyki w ocenie istotności różnic między grupami (testy parametryczne lub nieparametryczne).

Przechodząc do oceny rozdziału „Dyskusja” chciałbym podkreślić, że napisana jest ona w sposób logiczny i przejrzysty. Autor z dużą ostrożnością analizował celowość stosowanego układu badawczego jak również dawek kofeiny - 4 mg/jajo o udowodnionym działaniu teratogennym i dawce mniejszej 3,5 mg/jajo. Również dość ostrożnie analizował uzyskane wyniki rozróżniając dane morfologiczne z potencjalnym ich wpływem na obraz kliniczny w okresie postnatalnym.

Rozprawę zamyka sześć wniosków:

1. Kofeina prawdopodobnie przyspiesza rozwój i dojrzewanie układu oddechowego.
2. Potwierdzono doświadczalnie stymulujące działanie deksametazonu na dojrzewanie układu oddechowego.
3. Wpływ kofeiny na dojrzewanie układu oddechowego jest słabszy niż steroidów.
4. Nie wykazano istotnych różnic we wpływie dwóch różnych dawek kofeiny na rozwój

pneumocytów typu II.

5. Wykazano istnienie nieznanej dotychczas zależności pomiędzy stosowaniem kofeiny a przyśpieszeniem dojrzewania układu oddechowego. Prawdopodobnie istnieje dodatkowy mechanizm działania metyloksantyn na układ oddechowych

6. Kofeina podawana zarodkom kurzym wykazuje długotrwałe działanie. Iniekcja roztworu dokonywana była w 8. dobie rozwoju embrionalnego a istotny efekt farmakodynamiczny obserwowano w dobie 20. rozwoju.

Przedstawione wcześniej moje uwagi, które nasunęły mi się w trakcie czytania pracy, mają głównie charakter techniczny i w niczym nie ujmują mojej wysokiej jej oceny. Recenzowana praca stanowi przemyślaną koncepcyjnie, bardzo dobrze wykonaną i opisaną pod względem merytorycznym całość, co składa się na wartościową pracę naukową. Autor wykazał się dobrą znajomością literatury, a cytowane w pracy 164 pozycje piśmiennictwa, to prace starannie przez doktoranta dobrane.

W mojej ocenie recenzowana praca została wykonana samodzielnie i poprawnie. Wyciągnięte wnioski odzwierciedlają uzyskane wyniki i są zgodne z założonym celem pracy. Uważam, że praca, zgodnie z Ustawą z dnia 14 marca 2003 r o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule naukowym w zakresie sztuki. w pełni odpowiada wszystkim wymogom stawianym rozprawom doktorskim. Na tej podstawie przedkładam Wysokiej Radzie Wydziału Wojskowo-Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi wniosek o dopuszczenie lek. Tomasza Chlebnego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

dr hab. med. Jan Stetkiewicz, Prof. I.M.P.  
specjalista patomorfologii

Łódź dn. 23.03.2017