

dr hab. inż. Mariusz Korczyński, prof. nadzw. UPWr
Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

Wydział Biologii i Hodowli Zwierząt
Katedra Higieny Środowiska i Dobrostanu Zwierząt

RECENZJA

pracy doktorskiej lek. dent. **Aleksandry Całkosińskiej**

pt. „**Ocena wpływu ksantohumolu na efekty biologiczne wywołane działaniem tetrachlorodibenzo-p-dioksyny (TCDD)**”

promotor: prof. zw. dr hab. n. med. Marzena Dominiak

(Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu,

Wydział Lekarsko-Stomatologiczny)

promotor pomocniczy: dr n. med. Maciej Dobrzyński

(Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu,

Wydział Lekarsko-Stomatologiczny)

Podstawa formalna:

- **Pismo Pani prof. dr hab. n. med. Małgorzaty Radwan – Oczko, Dziekan Wydziału Lekarsko - Stomatologicznego, Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu z dnia 02.01.2019 r. (nr pisma DS/270/2018/2019)**

Ocena formalna

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska zawiera ogółem 95 ponumerowanych stron. Poszczególne rozdziały to: „Wykaz stosowanych

skrótów” s. 5-6 „Wstęp” s. 7-27, „Cel i założenia pracy” s. 37 - 38, „Materiał i metody” s. 39 - 43, z podziałem na podrozdziały dotyczące: materiału badawczego, użytych w doświadczeniu substancji chemicznych, analiz materiału biologicznego oraz metod i analiz statystycznych, jakim poddano uzyskane w doświadczeniu wyniki. Kolejny rozdział główny - „Wyniki”, zawiera bardzo syntetyczny opis uzyskanych rezultatów doświadczenia, podzielony jest na podrozdziały dotyczące kolejno oznaczanych makro i mikroelementów w tkance kostnej (s. 44 - 65). Dalsze części dysertacji to: „Dyskusja” s. 66 – 73, „Wnioski” s. 74 – 75 oraz „Streszczenia” s. 85 - 92. W *Bibliografii* wykazanych jest 135 pozycji literatury. Praca zawiera 18 tabel oraz 23 ryciny. Ma postać zwanego maszynopisu i została opracowana w języku polskim. Przedstawione w dysertacji rozdziały tworzą logiczną całość. Oceniana praca zawiera podstawowe elementy rozprawy doktorskiej, ma charakter naukowo-badawczy, napisana jest poprawnym, naukowym językiem i formalnie odpowiada wymogom zawartym w Ustawie z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. nr 65 poz. 595 z późn. zm.).

Ocena merytoryczna

A. Wstęp i źródła literatury

W rozdziale „Wstęp” Doktorantka w sposób syntetyczny przedstawiła znaczenie toksykologii dla nauk medycznych, ze szczególnym uwzględnieniem stomatologii. Tą częścią wstępu Autorka dysertacji zwraca również uwagę na istotną grupę ksenobiotyków, jakimi są trwałe związki organiczne (TZO), a ściślej na problem narażenia ludzi na te substancje, z którymi najczęściej mamy do czynienia na stanowiskach pracy.

W kolejnym podrozdziale Doktorantka w sposób kompleksowy i szeroki opisała strukturę i klasyfikację chemiczną dioksyn. Wskazała na przemysł ciężki i chemiczny jako główne ich źródło a żywność pochodzenia zwierzęcego jako wektor przedostawania się tych substancji do organizmu człowieka. Bardzo ciekawą i mocno rozbudowaną częścią tego podrozdziału jest opis molekularnego mechanizmu

działania TZO u kręgowców, a w szczególności u człowieka. Autorka słusznie zauważa, że podstawowe mechanizmy negatywnego działania dioksyn na organizm człowieka są związane ze zdolnością tych substancji do aktywacji receptora węglowodoru arylowego (AhR), wywoływania zaburzeń przemian mitochondrialnych komórek, wysokiej ich aktywności utleniającej, zaburzeń pracy narządów wydzielania dokrewnego czy też w końcu do wywoływania zaburzeń w metabolizmie tkanek twardych. Tak szerokie rozpoznanie tematu w tym podrozdziale Autorka oparła w dużym stopniu o doświadczenie i dorobek Promotorów, którzy jako pierwsi w Polsce oraz jedni z pierwszych w Europie podjęli się tematyki wpływu TCDD na metabolizm kości i zębów.

W kolejnej części wstępu Doktorantka opisała ksantohumol jako propozycję substancji pochodzenia naturalnego mogącą niwelować negatywne skutki zatrucia organizmu żywego ksenobiotykami, w tym TCDD. Prawidłowo przedstawiła mechanizmy aktywności biologicznej tej substancji w powiązaniu z jej budową i klasyfikacją chemiczną.

W ostatnim podrozdziale została przedstawiona tkanka kostna, jej budowa histologiczna oraz procesy metaboliczne związane z mineralizacją tejże.

Rozdział „Wstęp” jest bardzo obszerny i wielowątkowo wprowadza w tematykę, jakiej podjęła się Autorka w swoich badaniach.

W tej części pracy pojawiły się pewne niedociągnięcia natury porządkowej, które należałoby uwzględnić podczas przygotowania pracy do druku:

- ryciny 1 i 3, przedstawiające wzory strukturalne związków chemicznych, powinny być opracowane przez Autorkę samodzielnie, przy użyciu dedykowanego w tym celu oprogramowania, w czasopiśmie chemicznym jest to pożądane, gdyż eliminuje różnice w jakości rycin i pozwala unikać błędów merytorycznych;
- opisując dioksyny Doktorantka używa nazw zwyczajowych tych związków chemicznych oraz nazw nomenklatury IUPAC, natomiast ksantohumol odnajdujemy określony nazwą zwyczajową, zalecam w każdym przypadku używać wyłącznie nazw zwyczajowych lub nazw określonych przez Międzynarodową Unię Chemiczną, a najlepiej jednych i drugich jednocześnie.

- na str. 18 znajduje się stwierdzenie „zakażenie dioksynami” – czy takie pojęcie jest uzasadnione medycznie?

B. Część doświadczalna

Cel badań

Celem pracy była ocena możliwości wykorzystania ksantohumolu jako substancji wspomagającej prawidłową mineralizację kości oraz mogącą niwelować negatywny wpływ TCDD na ten proces fizjologiczny. Założenie, że zastosowanie ksantohumolu u przepiórek japońskich, intoksykowanych dioksyną będzie miało pozytywny wpływ na zawartość istotnych biologicznie mikro- i makroelementów w ich kości uważam za prawidłowo postawioną hipotezę badawczą.

W rozdziale tym zamieszczono część przeglądu piśmiennictwa, który wprost wskazuje na zasadność podjętych w pracy badań. Wydaje się, że ten opis powinien znaleźć się we wstępie i przeglądzie piśmiennictwa.

Materiał i metody

Zaplanowane doświadczenie zostało wykonane na przepiórkach japońskich. Ten model zwierzęcy został wybrany prawidłowo a jego wybór uzasadnia wysoka wrażliwość tych ptaków na dioksyny. Przepiórki zostały podzielone na 9 grup badawczych, w każdej po 7 sztuk. Układ doświadczenia jest prawidłowy a liczebność grup została ustalona dla zastosowania 2 dawek zarówno ksantohumolu jak i TCDD. Ponadto metodologia badania pozwoliła na wykonanie obserwacji w każdej z możliwych kombinacji obu czynników doświadczalnych. **DSMO w doświadczeniu użyto jako rozpuszczalnik dla dioksyn. Dodatkowo w grupie kontrolnej podano ptakom DMSO, jak stwierdziła Autorka, w celu eliminacji braku czynnika stresotwórczego, jakim jest iniekcja. Proszę Doktorantkę o wyjaśnienie, czy DSMO jest inertne biologicznie dla procesów mineralizacji tkanki kostnej. Odpowiedź na to pytanie jest istotna dla układu doświadczenia, gdyż z pracy nie wynika, aby ten rozpuszczalnik był stosowany w iniekcji w grupach II i III.**

Do badań tkanki kostne zostały pobrane *post mortem*, poddano je procesowi mineralizacji a w samych mineralizatach oznaczono wybrane biopierwiastki. Analizy

te zostały wykonane prawidłowo i uznanymi metodami, opartymi o normy polskie i europejskie. **Wątpliwość budzi użycie materiału referencyjnego, który stanowił matrycę wzorcową dla oznaczenia niektórych pierwiastków. Był nim wzorzec NCS ZC 73012. Proszę o wyjaśnienie zastosowania powyższego materiału odniesienia w stosunku do materiału badanego, jakim jest tkanka kostna. Na rynku dostępne są próbki referencyjne w postaci tkanki kostnej.**

Opisane w metodologii normy polskie i europejskie, na podstawie których wykonywano oznaczenia biopierwiastków w materiale biologicznym, powinny być zamieszczone również w spisie literatury.

Metody statystyczne użyte do analizy otrzymanych wyników zostały dobrane i wykorzystane prawidłowo, ale w opisie tych metod pojawia się pewna niejasność. **Na str. 41 jest mowa o użyciu statystyk opisowych, analizie wariancji jednoczynnikowej oraz testu Tukey'a, natomiast na str. 43 opis użytych metod obliczeniowych jest już inny, mówiący również o statystykach opisowych, ale pojawia się stwierdzenie o testowaniu normalności rozkładu wyników, użyciu analizy wariancji dwuczynnikowej oraz innych testach post hoc, dedykowanych danym transformowanym. Mimo jasno określonych w rozdziale „Wyniki” metodach statystycznych dla poszczególnych parametrów, opis zawarty w rozdziale „Materiał i metody” należy zweryfikować, uporządkować i umieścić w jednym podrozdziale, wskazując, do których parametrów użyto jakich metod obliczeniowych.**

Rozdziały:

Omówienie wyników i Dyskusja

Autorka przedstawiła uzyskane wyniki w sposób bardzo syntetyczny, co nadaje im przejrzystości. Zostały one umieszczone w czytelnych tabelach i na wykresach. Opisy zawarte w tym rozdziale to komentarze do poszczególnych tabel i wykresów, odnoszące się do współzależności pomiędzy stosowaniem

ksantohumolu i TCDD u przepiórek a zawartością poszczególnych makro- i mikroelementów w ich tkance kostnej.

Na szczególne podkreślenie zasługują wyniki doświadczenia, które wskazują na pozytywny/protekcyjny efekt stosowania ksantohumolu jako antagonisty dioksyny, powodującego minimalizację negatywnego wpływu tej trucizny na fizjologię i strukturę szkieletu badanych ptaków. Wyniki uzyskane przez Doktorantkę dają również odpowiedź na pytanie, w jakim stopniu i w jakiej dawce użyta dioksyna zaburza gospodarkę mineralną tkanki kostnej, co było bardzo widoczne w grupach zwierząt intoksykowanych ksenobiotykiem bez jednoczesnego podawania czynnika ochronnego.

Skromny a jednocześnie syntetyczny opis wyników uznaję za cechę pozytywną tej części pracy. Doktorantka skupiła się w nim wyłącznie na istotnych rezultatach, co powoduje, że ta część pracy jest bardzo czytelna.

Dyskusja zawarta w osobnym rozdziale została przedstawiona prawidłowo. Jej konstrukcja opiera się na przedstawieniu najważniejszych wyników uzyskanych przez Autorkę, odniesieniu ich do źródeł literatury w zakresie badanego zagadnienia oraz wykazaniu potencjalnych interakcji pomiędzy czynnikami doświadczalnymi a uzyskanymi rezultatami. Tematycznie jest ona ukierunkowana na zagadnienia związane bezpośrednio z poruszonym w pracy tematem. Wyniki dotyczące negatywnego wpływu dioksyn na mineralizację tkanki kostnej, uzyskane w doświadczeniu własnym Autorki znajdują potwierdzenie w cytowanym piśmiennictwie. Doktorantka na podstawie przytoczonej literatury w sposób prawidłowy wnioskuje i objaśnia mechanizmy, które mogły mieć wpływ na uzyskane przez nią wartości. Reasumując, rozdział ten jest opracowany rzetelnie i nie jest on tylko konfrontacją wyników własnych z rezultatami uzyskanymi przez innych autorów.

W obu rozdziałach pojawiły się jednak małe niedociągnięcia natury redakcyjnej:

- **str. 53, Autorka użyła sformułowania „w łapce” zamiast w kości kończyny tylnej;**
- **str. 56, „Dopiero dawka...powoduje lekki spadek stężenia fosforu”, proszę unikać w opisie wyników tak niejednoznacznych sformułowań;**

- w pracy pojawia się często określenie „stężenie ...w tkance kostnej” stężenie dotyczy zawartości w ośrodku o danej objętości a w przypadku wyników pracy mamy do czynienia z zawartością;

Wnioski

W rozdziale tym Doktorantka w sposób bardzo jasny przedstawiła najważniejsze wyniki i wnioski z nich płynące. Wnioski te są obszerne a jednocześnie oddają szczegóły tychże wyników, które należy uznać za ważne i wartościowe.

Piśmiennictwo

Autorka przedstawiła 135 pozycji literatury (krajowej i zagranicznej), z której znaczna ilość pochodzi z ostatnich 10 lat. Dobór piśmiennictwa jest prawidłowy, poszczególne pozycje są w pełni wykorzystane w tekście dysertacji. Prace są właściwie cytowane, tzn. podane są pełne ich tytuły oraz zakres stron cytowanych artykułów i podręczników.

W spisie brakuje norm opisujących metodologię analiz pierwiastkowych, które odnajdujemy w rozdziale „Materiał i metody”.

Podsumowanie recenzji i wniosek końcowy

Oceniane doświadczenie było bardzo trudne do przeprowadzenia, z uwagi na szeroki zakres analiz laboratoryjnych. Wymagało ono dużej wiedzy i nakładu pracy. Doktorantka wykazała się dobrym teoretycznym i praktycznym przygotowaniem, staranną organizacją warsztatu badawczego oraz znajomością odpowiednich technik analitycznych.

Wymienione z obowiązku recenzenta niedociągnięcia i usterki powinny być uwzględnione przy przygotowywaniu pracy do publikacji. Mają one charakter dyskusyjny. Nie umniejszają one merytorycznej wartości pracy, którą ogólnie

oceniam dobrze. Rozprawa wnosi do nauki istotne elementy poznawcze, jej tematyka jest bardzo aktualna, szczególnie w aspekcie coraz większej chemizacji życia człowieka i jego otoczenia.

Autorka pracy jest lekarzem dentystą a wszystkie poczynione uwagi dotyczą części chemicznej pracy, pracy z pogranicza toksykologii, chemii i medycyny. Mimo nieznacznych mankamentów, w mojej opinii praca spełnia kryteria dla dysertacji doktorskich określonych w *Ustawie z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki* (Dz.U. nr 65 poz. 595 z późn. zm.). Wnoszę więc do **Wysokiej Rady Wydziału Lekarsko - Stomatologicznego, Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu** o dopuszczenie lek. dent. Aleksandry Całkosińskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Wrocław, 15 lutego 2019 r.

dr hab. inż. Mariusz Korczyński,
prof. nadzw. UPWr

