

OCENA

rozprawy doktorskiej mgr Blanki Sekleckiej pt. „Badania *in vitro* i *in vivo* (model zwierzęcy *Sus scrofa domesticus*) nad zastosowaniem enzymu dekarboksylazy szczawianowej (OXDC) do obniżenia poziomu szczawianów w krwi” wykonanej pod kierunkiem Prof. dr hab. Stefana Grzegorza Pierzynowskiego w Zakładzie Biologii Medycznej Instytutu Medycyny Wsi im. Witolda Chodźki w Lublinie.

Zwiększone stężenie kwasu szczawowego we krwi jest przyczyną powstawania hiperoksalurii prowadzącej do kamicy układu moczowego lub postępującej nefrokalcynozy. Kwas szczawowy jest końcowym produktem przemiany materii i jest wydalany głównie przez nerki, gdzie dochodzi do odkładania kryształów szczawianu wapnia.

W etiopatogenezie hiperoksalurii odróżnia się dwie grupy przyczyn jej powstawania. Pierwsza z nich to autosomalne recesywne dziedziczące się choroby przemiany kwasu glioksalowego powodujące pierwotne hiperoksalurie (PH) oraz druga, to nadmierne wchłanianie kwasu szczawowego z przewodu pokarmowego powodujące wtórne hiperoksalurie.

W pierwotnych hiperoksaluriach w wyniku różnych defektów enzymatycznych dochodzi do nadprodukcji kwasu szczawowego, który następnie w nadmiarze wydalany jest w moczu. W pierwotnej hiperoksalurii typu I (PH I) oprócz kwasu szczawowego, w nadmiarze wydala się kwas glikolowy. Jej przyczyną jest obniżona lub całkowicie nieobecna aktywność, względnie nieprawidłowa lokalizacja wewnątrzkomórkowa specyficznego wątrobowego, peroksysomalnego enzymu- aminotransferazy alaninoglikosylanowej (AGT).

W hiperoksalurii typu II (PH II) oprócz kwasu szczawowego, w nadmiarze wydala się kwas L- glicerynowy. Przyczyną jest zmniejszona aktywność enzymu- reduktazy glioksolanowej (enzym o aktywności dehydrogenazy kwasu D-glicerynowego i reduktazy hydroksypirogronianowej).

Hiperoksalurie wtórne wynikają zarówno ze spożywania nadmiernych ilości pokarmów bogatoszczawianowych, jak również w wyniku zaburzeń wchłaniania jelitowego tak jak ma to miejsce w mukowiscydozie, w chorobie Crohna czy też u pewnej ilości osób, którzy przechodzili operację omięcia żołądka i części jelita cienkiego (Roux-en-Y bypass - RYGB).

Hiperoksaluria ($>1,0$ mmol/1,73 m²/24h, norma u dorosłych $<0,5$, u dzieci $<0,37$ mmol/1,73 m²/24h) prowadzi do nawracającej kamicy i/lub do postępującej nefrokalcynozy oraz do zwiększonego ryzyka niewydolności nerek. Wskutek tego u wielu pacjentów z pierwotną hiperoksalurią dochodzi do konieczności rozpoczęcia dializoterapii.

Z obecnego stanu wiedzy wynika, że żadna forma dializy nie eliminuje odpowiednich ilości szczawianów z organizmu i postępowanie takie, jedynie daje przemijający efekt krótkoterminowy.

Powyższe problemy wskazują wyraźnie na konieczność poszukiwania alternatywnych i bardziej skutecznych metod eliminacji szczawianów z organizmu, które pozwoliłyby na zminimalizowanie lub zapobiegłyby wielonarządowemu odkładaniu tego metabolitu i powstaniu układowej szczawianicy.

W związku z powyższym, podjęte przez Autorkę badania zmierzające do określenia możliwości zastosowania enzymu dekarboksylazy szczawianowej (OXDC) w dializie otrzewnowej na przykładzie zwierzęcego modelu hiperoksalurii oraz na podstawie testów *in vitro* są jak najbardziej uzasadnione.

Przedstawiona do oceny praca ma charakter oryginalnej rozprawy doktorskiej, przygotowanej wg wymagań uczelnianych (strony tytułowe, spis treści, wstęp, cel badań, materiał i metody, wyniki i ich omówienie, dyskusja, wnioski, piśmiennictwo, streszczenie w języku polskim i angielskim, wykaz stosowanych skrótów). Praca została napisana na 64 stronach formatu A4 i zawiera 15 rycin, 4 tabele i 72 pozycje piśmiennictwa w większości anglojęzycznego, z czego ponad połowa pochodzi z ostatnich 10 lat.

W pierwszej części wstępu liczącym 16 stron, Autorka podkreśliła istniejący problem z dysfunkcją nerek u osób wykazujących wysokie stężenia szczawianów we krwi (hiperoksalemia) oraz konieczność transplantacji nerek i/lub wątroby i nerek w zależności od przyczyny choroby. W dalszej części wstępu opisującego aktualny stan wiedzy, Autorka w klarowny sposób wprowadza czytelnika w tematykę badawczą w 4 wydzielonych podrozdziałach. Pierwszy podrozdział zajmujący 6 stron dotyczy etiopatogenezy hiperoksalurii. W drugim podrozdziale zajmującym 1,5 strony, opisuje sposoby i metody diagnozowania hiperoksalurii. W trzecim podrozdziale zajmującym 3,5 strony, Autorka dostarcza czytelnikowi informacji na temat stosowanych metod leczenia hiperoksalurii, przedstawiając rolę dializy i transplantacji nerek i/lub wątroby i nerek. W czwartym podrozdziale zajmującym 4 strony, Autorka przedstawiła perspektywy alternatywnego leczenia hiperoksalurii i położyła główny nacisk na zastosowanie enzymów degradujących szczawiany, poświęcając temu zagadnieniu 2 strony. Słusznie zwraca uwagę na korzyści zdrowotne wynikające z zastosowania w dializie otrzewnowej bakteryjnego enzymu degradującego szczawiany u ludzi cierpiących na hiperoksalurie.

Cel pracy został sformułowany jasno, zrozumiale i jest zgodny z tytułem pracy. Należy podkreślić trafność doboru celu badań, który obejmuje różne poznawcze aspekty zastosowania bakteryjnego enzymu dekarboksylazy szczawianowej w dializie otrzewnowej w celu usprawnienia eliminacji metabolitów kwasu glioksalowego. Zgodnie z założeniami badawczymi, Doktorantka postanowiła opracować model *in vitro* naśladujący dializę otrzewnową aby określić optymalne dawkowanie enzymu i czas działania. Ponadto, Doktorantka podjęła się opracowania modelu zwierzęcego z wykorzystaniem świni domowej do wywoływania hiperoksalurii imitującej przebieg pierwotnej hiperoksalurii o różnym stopniu nasilenia, umożliwiającą określenie zawartości szczawianów we krwi i w tkankach oraz określenie czasu trwania dializy otrzewnowej w celu eliminacji szczawianów w warunkach stosowania lub braku stosowania dekarboksylazy szczawianowej.

Rozdział „Materiał i metody” został opracowany na 12 stronach i zawiera 3 ryciny. W pierwszym podrozdziale, Autorka zamieściła informacje na temat zwierząt, ich warunki żywienia i utrzymania zapewniające komfort podczas doświadczeń. Zamieściła zdjęcia klatek, które pozwalają na zbieranie moczu oddzielonego od kału do oznaczenia stężenia szczawianów. Badania przeprowadzono na homogennym materiale stanowiącym 36 warchlaków o początkowej średniej masie ciała $12,1 \pm 0,8$ kg w wieku 40 dni. Do realizacji zamierzonego celu tworzenia zwierzęcego modelu badawczego indukowania hiperoksalurii, Autorka przeprowadziła zabiegi chirurgiczne polegające na implantacji kaniul do żyły szyjnej zewnętrznej oraz kaniul do jamy otrzewnowej. W trzecim podrozdziale, Autorka opisała procedury i metody przygotowania prób oraz analizy szczawianów w surowicy, moczu, kale oraz w płynie dializacyjnym. Czwarty podrozdział Doktorantka poświęciła na omówienie

układów doświadczalnych, które podzieliła na doświadczenia *in vitro* oraz *in vivo* mające służyć do sprawdzenia hipotez badawczych słuszności zastosowania dekarboksylazy szczawianowej w dializie otrzewnowej. Przedstawia szczegółowy opis przeprowadzonych doświadczeń i analiz szczawianów w różnych płynach ustrojowych i treści różnych odcinków przewodu pokarmowego badanych zwierząt. Do tego celu posłużyła się techniką chromatografii jonowymiennej. Ponadto, opisuje metodę histochemiczną zastosowaną do oceny histopatologicznej tkanki nerek. Całość opisów postępowań metodycznych spełnia najwyższe wymagania stawiane współczesnym pracom badawczym, a wyniki świadczą o bardzo dobrym opanowaniu warsztatu badawczego i jego znajomości praktycznej przez Autorkę dysertacji. W piątym podrozdziale, Doktorantka opisuje analizę statystyczną, której poddała otrzymane wyniki w celu weryfikacji istności zmian. Zastosowała jednoczynnikową analizę wariancji oraz test Tukeya do analizy wyników biometrycznych, zaś test wielokrotnego rozstępu i test Kruskal-Wallisa dla uzyskanych stężeń szczawianów w badanych próbkach.

Wyniki badań zostały zamieszczone na 11 stronach zawierających 2 tabele i 11 rycin. Porównując wyniki badań *in vitro*, Autorka stwierdziła, że najmniejsza ilość dekarboksylazy szczawianowej zdolna do obniżenia stężenia szczawianów w surowicy krwi wynosi 10 mg/ml. Efekt ten został osiągnięty w czasie 4 godzin i wynosił 35% dla 10 mg/ml zaś, zwiększenie udziału enzymu do 30 mg/ml obniżyło poziom szczawianów o 60%. Ponadto, Doktorantka stwierdziła wyższe wartości eliminacji szczawianów wynoszące 83% w warunkach stosowania dodatku dekarboksylazy szczawianowej w porównaniu do 23% uzyskanych w modelu dializy otrzewnowej bez dodatku enzymu.

Przedstawiając wyniki badań na modelu hiperoksalemii *in vivo*, Doktorantka wykazała jego przydatność w tych badaniach poprzez indukcję trzech różnych poziomów szczawianów w osoczu krwi, które były zależne od stosowanej dawki i utrzymywały się przez 12 godzin wykazując w tym czasie również zwiększony poziom szczawianów w moczu. Wyniki te mieszczą się w przedziałach stwierdzanych we krwi pacjentów z hiperoksalurią pierwotną. Wyniki badań na modelu przewlekłej hiperoksalurii przedstawione przez Doktorantkę wykazały, że ilość podawanych szczawianów dożylnie (2 ml 1% roztworu) w bolusach co 30 minut spowodowała wzrost ich stężenia we krwi do 176,1 $\mu\text{mol/l}$ po 7 dniach od podawania, lecz ze względu na zły stan zdrowia zwierząt przerwano działanie po 11 dniach. Podobnie, stosowanie wlewu z szybkością 12ml/godzinę doprowadziło do wzrostu stężenia szczawianów w surowicy krwi do wartości 306,3 $\mu\text{mol/l}$, co spowodowało zły stan zdrowia zwierząt po 7 dniach doświadczenia. W próbkach nerek tych zwierząt Doktorantka stwierdziła czterokrotnie większe odkładanie się szczawianów w korze i rdzeniu.

Porównując skuteczność dializy otrzewnowej w warunkach stosowania dodatku dekarboksylazy szczawianowej i bez stosowania tego dodatku doktorantka wykazała istotnie niższe wartości pola pod krzywą stężenia szczawianów w surowicy krwi i w płynie dializacyjnym w warunkach zastosowania dekarboksylazy szczawianowej.

Interesujące są dane otrzymane w doświadczeniu mającym na celu określenie istnienia aktywnego i/lub biernego wydzielania szczawianów z krwi do przewodu pokarmowego. Z przedstawionych przez Doktorantkę wyników stwierdzić można, że proces ten ma miejsce i najintensywniej przebiega w żołądku i okrężnicy i zależny jest od czasu pobierania próbki od zakończenia wlewu dożylnego szczawianów.

W rozdziale „Dyskusja”, przeprowadzonej na 6 stronach, Autorka skonfrontowała swoje wyniki z wynikami uzyskanymi przez innych autorów i w jasny sposób wypunktowała oryginalne wyniki.

Na podstawie uzyskanych wyników Autorka sformułowała 5 wniosków końcowych, które są odpowiedzią na podstawione cele. Podkreślają one ważność wypracowanych modeli

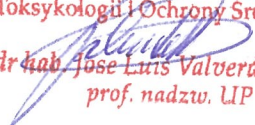
zarówno *in vitro* jak *in vivo* dla badania alternatywnych rozwiązań w dializie otrzewnowej w chorobach nerek.

Z obowiązku recenzenta pragnę zwrócić uwagę na niektóre uchybienia zauważone przeze mnie podczas czytania rozprawy, które powinny zostać poprawione przy oddaniu pracy do druku.

1. W rozdziale „Przegląd literatury” omawiając przyczyny hiperoksalurii pierwotnej na stronie 9 w 15 wierszu, Doktorantka używa określenie „chora wątroba” co jest określeniem potocznym i należy go zastąpić określeniem naukowym np. „dysfunkcja wątroby”.
2. Na stronie 14 wiersz 12, użyto określenie: „...i określeniem wydzielin moczowych szczawianu i wapnia...”, jest to nieprawidłowe, gdyż tu ma miejsce proces wydalania, ponieważ organizm pozbywa się szczawianów tą drogą. Ponadto dalsza część zdania „ oraz substancji hamujących kamienie, jest niezrozumiałe, można się domyślać, że Doktorantce chodzi o substancje hamujące odkładanie kryształków szczawianu wapnia i tworzenie się kamieni nerkowych.
3. W rozdziale „Materiały i metody”, na stronie 29 wiersz 9, został użyty wyraz „osocza” a jak wynika z opisów w badaniach użyto surowicę.
4. Na stronie 31, tytuł podrozdziału 4.4.4. Doświadczenie 4. „Wpływ infuzji roztworu szczawianu sodu do krwi, na ilość szczawianów odprowadzanych przez zwierzę wraz z moczem” należałoby bardziej sprecyzować, gdyż chodzi o wydalanie a nie o odprowadzanie np. „Wpływ dożylnych infuzji roztworu szczawianu sodu na ilość szczawianów wydalanych w moczu”.
5. Na stronie 34 wiersz 26, wymienione są odcinki przewodu pokarmowego, z których próbki treści zostały pobrane lecz opis ten jest niejasny, można się domyślać, że chodzi o odcinek doczaszkowy i doogonowy jelita cienkiego, gdyż dalej są wymienione odcinki jelita grubego.
6. W rozdziale „Wyniki i ich omówienie” Autorka stosuje jednostki miar nie należące do układu SI, jak również stosuje kropki jako dzielnik dziesiętnych części jednostki zamiast przecinka.
7. Na stronie 42, w tabeli 3 oprócz średnich wartości średniego dziennego spożycia pokarmu powinny być podane jakie było odchylenie standardowe. Na tej samej stronie w tytule ryciny 11 napisane jest, że są to wyniki oceny histologicznej zwierząt poddanych infuzji w doświadczeniu 5. Niejasne jasne czy to dotyczy zwierząt w całości czy też chodzi o jakiś narząd tych zwierząt w szczególności.
8. Na stronie 43 rycina 12, brak opisu, której części nerki jaki panel przedstawia (która to kora, który to rdzeń), brak jest informacji o powiększeniach przedstawionych zdjęć mikroskopowych, jak również jest brak skali na zdjęciach. Wyraz slajd należy zastąpić właściwym polskim wyrazem odpowiednim do przedstawionego obrazu np. „zdjęcie mikroskopowe”.
9. W 7 wierszu stwierdzenie, że „Kumulacja szczawianów w tkankach zwierząt grupy 1 sięgnęła 19,5% podczas, gdy w grupie 2 wynosiła 4,5%” jest nie właściwe, ponieważ jak wynika z przedstawionych badań określono to dla nerek a nie dla całego organizmu.
10. Na stronie 46, rycina 15, w podpisie odcinków przewodu pokarmowego pojawia ponownie problem należytego nazewnictwa.
11. W rozdziale „Piśmiennictwo”, znalazło się 8 pozycji (9, 21, 24, 33, 46, 52, 70, 71), które nie były cytowane w tekście.

Wniosek końcowy

Po dokładnym zapoznaniu się z pracą doktorską mgr Blanki Sekleckiej uważam, że Autorka pracy posiadała wymaganą znajomość warsztatu metodycznego, potrafi te umiejętności odpowiednio wykorzystać w pracy badawczej, a otrzymane wyniki logicznie zinterpretować. Praca dokumentuje w moim przekonaniu kilka ważnych odkryć medycznych o dużym znaczeniu praktycznym, a uwagi krytyczne dotyczą jedynie drobnych usterek redakcyjnych i nie umniejszają wysokiej wartości naukowej dysertacji. Mając powyższe na uwadze, pragnę stwierdzić, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska mgr Blanki Sekleckiej pt. „Badania *in vitro* i *in vivo* (model zwierzęcy *Sus scrofa domesticus*) nad zastosowaniem enzymu dekarboksylazy szczawianowej (OXDC) do obniżenia poziomu szczawianów w krwi” w pełni odpowiada warunkom określonym w art. 13 ustawy z dnia 14 marca 2003r. z późniejszymi zmianami „O stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki” i wnoszę do Wysokiej Rady Instytutu Medycyny Wsi w Lublinie wniosek o dopuszczenie mgr Blanki Sekleckiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Kierownik Zakładu
Toksykologii i Ochrony Środowiska

dr hab. Jose Luis Valverde Piedra
prof. nadzw. ULP