

## OCENA

rozprawy doktorskiej mgr Anny Wolniakowskiej na temat:

„Ocena ochronnego działania D-metioniny na narząd słuchu w urazie akustycznym”

W świetle dzisiejszej wiedzy upośledzenie słuchu spowodowane hałasem jest nieodwracalne gdyż nabłonek zmysłowy uszkodzonego ślimaka ma ograniczony potencjał regeneracyjny. Hałas stale towarzyszy działalności człowieka, a my nadal posiadamy ograniczone możliwości wyeliminowania go z naszego środowiska. Badania z ostatniego dziesięciolecia wykazały dominującą rolę stresu oksydacyjnego w rozwoju niedosłuchu wywołanego hałasem i jest to przyczynkiem do poszukiwania środków terapeutycznych, które wzmocnią obronę antyoksydacyjną. Szczególny potencjał ochronny wśród antyoksydantów mogących mieć zastosowanie u osób narażonych na hałas posiada metionina, naturalny aminokwas występujący w diecie człowieka. W badaniach eksperymentalnych stwierdzono, że izomer D-metioniny stosowany u zwierząt doświadczalnych zmniejsza głębokość uszkodzenia słuchu spowodowanego przez leki ototoksyczne i hałas.

Należy podkreślić, że wybór tematyki badawczej przez mgr Annę Wolniakowską jest bardzo trafny i odpowiada na aktualne zapotrzebowanie w dziedzinie badań nad patologią narządu słuchu, tym bardziej, że obok poznania mechanizmów ochronnego działania D-metioniny wyznaczone zostały kierunki działań mogących mieć znaczenie praktyczne w opracowaniu leków pozwalających na zwiększenie mechanizmów obronnych narządu słuchu.

Podjęte badania w znakomity sposób uzupełniają i w znacznym stopniu rozszerzają dotychczasowy stan wiedzy z zakresu profilaktyki uszkodzeń słuchu spowodowanych hałasem.

Bogato ilustrowana praca, napisana piękną polszczyzną, perfekcyjnie przygotowana pod względem edytorskim liczy 90 strony i składa się z 11 rozdziałów. Doskonale skomponowane ryciny w liczbie 17 właściwie ilustrują przekazywane treści. Aktualne i umiejętnie dobrane piśmiennictwo, głównie anglojęzyczne, obejmuje 186 pozycji.

W przejrzystym napisanym wprowadzeniu mgr Anna Wolniakowska zebrała wszystkie aktualne i niezbędne informacje dotyczące istotnych dla projektu zagadnień związanych z uszkodzeniami słuchu w następstwie hałasu, roli stresu oksydacyjnego oraz ochronnego działania związków antyoksydacyjnych w tego typu uszkodzeniach. Ten dwudziestostronicowy rozdział wart jest oddzielnego opublikowania jako cenna praca pogładowa przeznaczona dla otorynolaryngologów, audiologów i foniatorów. Opracowany przez doktorantkę schemat szlaków apoptotycznych indukowanych stresem oksydacyjnym świetnie ilustruje treści przekazane we wprowadzeniu.

Cel pracy określony jako ocena mechanizmów ochronnego wpływu D-metioniny na narząd słuchu myszy w urazie akustycznym uzupełniony jest o cztery cele szczegółowe obejmujące ocenę progów słuchowych, ocenę aktywności markerów stresu oksydacyjnego i określenie ekspresji genów kodujących syntezę markerów stresu oksydacyjnego u myszy, które otrzymywały D-metioninę i którym nie podawano D-metioniny, w odniesieniu do zwierząt kontrolnych nienarażonych na hałas. Ostatnim zaplanowanym zadaniem jest wyznaczenie skutecznej dawki D-metioniny działającej ochronnie w urazie akustycznym u myszy.

Badania przeprowadzono na sześciotygodniowych samcach myszy szczepu obciążonego recesywną mutacją genu na chromosomie 10 locus *ahl* charakteryzujących się przyspieszoną utratą słuchu. Wybór młodych zwierząt był w

pełni przemyślany i podyktowany został potrzebą zminimalizowania wpływu procesu starzenia na wyniki badań. Konstrukcja metodyki badań umożliwiła przeprowadzenie kompleksowej oceny prawie wszystkich niezbędnych zagadnień związanych z narażeniem na hałas, umożliwiając wytyczenie kierunków badań nad farmakologiczną profilaktyką uszkodzeń słuchu spowodowanych hałasem. Zwierzęta podzielono na 5 odpowiednio dobranych grup: grupę kontrolną bez ekspozycji na hałas i bez podawania D-metioniny, kolejną grupę poddaną działaniu hałasu bez podawania D-metioniny i dalsze 3 grupy narażone na hałas, u których zastosowane różne dawki D-metioniny. Ocenę zmian progów słuchowych przeprowadzono za pomocą badania słuchowych potencjałów wywołanych pnia mózgu, a w celu oceny uszkodzenia słuchu porównywano wartości progów słuchowych uzyskanych przed i po ekspozycji na hałas. Do oceny procesów oksydacyjnych zostały zastosowane pomiary poziomu aktywności enzymów będących markerami stresu oksydacyjnego w tkankach ślimaka - dysmutaz ponadtlenkowych i katalazy. W celu oceny ekspresji genów kodujących wybrane markery stresu oksydacyjnego w tkankach ślimaka wykorzystano metodę real-time PCR poprzedzoną odwrotną transkrypcją.

Wyniki badań zostały przedstawione w sposób bardzo przejrzysty umożliwiając czytelnikowi śledzenie wszelkich szczegółowych informacji wynikających z badań. Wyniki badań obejmowały porównanie zmiany progów słuchu po narażeniu na hałas, ocenę aktywności markerów stresu oksydacyjnego i ocenę ekspresji genów kodujących wybrane markery stresu oksydacyjnego po narażeniu na hałas. Mgr Anna Wolniakowska wykazała, że D-metionina powoduje zależne od dawki istotne statystycznie zmniejszenie wielkości przesunięcia progów słuchu. Badania dotyczące wybranych markerów stresu oksydacyjnego także wykazały istotny statystycznie wzrost aktywności dysmutaz ponadtlenkowych w tkankach

ślimaka. Z kolei obserwowano zahamowanie wzrostu aktywności katalazy. Równie ciekawe były badania dotyczące ekspresji genów kodujących syntezę wybranych markerów stresu oksydacyjnego, które wykazały spadek ekspresji genów kodujących cytoplazmatyczną i mitochondrialną dysmutazę ponadtlenkową.

W dyskusji mgr Anna Wolniakowska w interesujący sposób wyniki swoich badań odniosła do danych literaturowych. Rozdział ten napisany został w sposób wyjątkowo dojrzale z uwzględnieniem najnowszego piśmiennictwa. Doktorantka słusznie wskazuje na oryginalność przeprowadzonych badań. Dotychczasowe badania nad wpływem D-metioniny na procesy oksydacyjne zachodzące po narażeniu na hałas prowadzone były na poziomie markerów biochemicznych. Oryginalnością przeprowadzonych badań była ocena procesów oksydacyjnych również na poziomie ekspresji kodujących je genów. Słusznie założono, że dopiero zmiany na poziomie genów są właściwym dowodem na udział D-metioniny w procesie stresu oksydacyjnego. Bardzo interesującą częścią dyskusji były rozważania na temat czasu podjęcia interwencji farmakologicznej u zwierząt narażonych na hałas.

W ocenie otoprotekcyjnego działania metioniny brakuje dotychczas ujednoczonych pod względem modelu zwierzęcego parametrów hałasu, czasu trwania narażenia i metod oceniania efektu. Wydaje się, że metodyka podana przez doktorantkę może stanowić ciekawą propozycję dla ośrodków zajmujących się badaniami z tego zakresu. Należy podkreślić, że wyniki zawarte w pracy doktorskiej mgr Anny Wolniakowskiej mogą zostać wykorzystane podczas opracowywania interwencji farmakologicznej u ludzi narażonych na działanie hałasu.

Praca zakończona jest podsumowaniem wyników i pięcioma w pełni udokumentowanymi wnioskami stanowiącymi odpowiedź na pytania zawarte w szczegółowych celach pracy.

Podsumowując stwierdzam, że jest to praca doktorska o wyjątkowej jakości, charakteryzująca się oryginalnością podjętych badań, której wyniki pomocne będą podczas opracowywania farmakologicznej profilaktyki i prewencji uszkodzeń słuchu spowodowanych hałasem. Jako uzupełnienie oceny pracy doktorskiej pragnę dodać moje niewielkie uwagi dotyczące metodyki. Brakuje mi nieco dokładniejszego przedstawienie sposobu preparatyki ślimaka oraz zademonstrowania przykładowych pomiarów słuchowych potencjałów wywołanych pnia mózgu. Proponuję rozważyć zastąpienie pojęcia „ucho wewnętrzne” nazwą „ślimak” gdyż głównie ten element anatomiczny narządu słuchu poddano badaniom przedstawionym w pracy doktorskiej. Te uwagi w żaden sposób nie umniejszają wartości tej ciekawej pracy.

Przedstawiona do oceny praca w pełni odpowiada warunkom stawianym rozprawom doktorskim. Z uwagi na jej jakość, oryginalność i potencjał zastosowania wyników badań w praktyce klinicznej zgłaszam wniosek o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr Anny Wolniakowskiej.

Mam zaszczyt zgłosić do Rady Naukowej Instytutu Medycyny Pracy im. prof. dra med. Jerzego Nofera w Łodzi wniosek o dopuszczenie mgr Anny Wolniakowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

KIEROWNIK  
Kliniki Otolaryngologii  
prof. dr hab. med. Marek Rogowski

Białystok, 18. 04.2019

Prof. dr hab. med. Marek Rogowski