

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Anny Wolniakowskiej pt. „OCENA OCHRONNEGO DZIAŁANIA D-METIONINY NA NARZĄD SŁUCHU W URAZIE AKUSTYCZNYM”**

Hałas jest najczęściej występującym na stanowiskach pracy czynnikiem szkodliwym (szacunkowo, na świecie ponad 600 milionów ludzi, tj. 12% globalnej populacji może być narażonych na hałas o poziomach stwarzających ryzyko uszkodzenia słuchu). Uszkodzenie słuchu spowodowane hałasem (NIHL) jest na dzień dzisiejszy procesem nieodwracalnym. Konieczne jest zatem poszukiwanie środków terapeutycznych pozwalających na zwiększenie mechanizmów obronnych narządu słuchu. Ponieważ uważa się, że w patomechanizmie NIHL wiodącą rolę odgrywa stres oksydacyjny, prowadzone badania w znaczącej mierze dotyczą protekcyjnej roli egzogennych środków terapeutycznych, które mogłyby skutecznie wzmocnić endogenne mechanizmy antyoksydacyjne po narażeniu na hałas. Praca doktorska mgr Anny Wolniakowskiej wpisuje się w te działania, w związku z czym oprócz wartości poznawczej ma potencjalne walory aplikacyjne.

Układ prezentowanej rozprawy doktorskiej jest typowy dla pracy naukowej. Składa się z 7 rozdziałów, wykazu stosowanych skrótów, zgody Komisji Bioetycznej na doświadczenia na zwierzętach oraz streszczeń w języku polskim i angielskim.

Pierwszy (20. stronicowy) rozdział pt. WPROWADZENIE zawiera podstawowe informacje literaturowe na temat zagadnień poruszanych w rozprawie, tj. na temat uszkodzeń słuchu spowodowanych hałasem (ich patofizjologią, obrazem klinicznym a także rolą profilaktyki i prewencji w przeciwdziałaniu uszkodzeniom) oraz roli stresu oksydacyjnego w rozwoju tych uszkodzeń i ochronnemu działaniu związków antyoksydacyjnych (L-NAC, ebselenu, witaminy A, C, E oraz D-metioniny). Analiza tego rozdziału pozwala stwierdzić, że Doktorantka z dużą swobodą i głębokim zrozumieniem porusza się w obszarze zagadnień związanych ze stresem oksydacyjnym i mechanizmami ochronnymi przed reaktywnymi formami tlenu i azotu, przedstawiając w pracy jedynie najważniejsze informacje dotyczące tych zagadnień (odpowiedni, skondensowany dobór informacji nie jest sprawą łatwą).

Szczególną uwagę poświęciła Autorka przedstawieniu informacji na temat dotychczasowych badań egzogennych środków terapeutycznych wzmacniających endogenną obronę antyoksydacyjną. Dokonała tego na podstawie przeglądu około 50 prac, co świadczy o dogłębnym poznaniu tematu. Z przeglądu wynika, że dotychczas nie do końca rozpoznane są ich molekularne mechanizmy działania i skuteczność ich stosowania u ludzi narażonych na hałas.

W związku z tym, swoją pracę mgr Wolniakowska poświęciła ocenie mechanizmów ochronnego wpływu D-metioniny (D-Met) na narząd słuchu myszy w urazie akustycznym. W rozdziale 2 przedstawiła cele pracy, w tym również cele szczegółowe, które obejmowały:

1. Porównanie zmian progów słuchu po narażeniu na hałas u myszy, które otrzymywały D-Met i którym nie podawano D-Met, w odniesieniu do zwierząt kontrolnych, nienarażonych na hałas.
2. Porównanie aktywności wybranych markerów stresu oksydacyjnego po narażeniu na hałas u myszy, które otrzymywały D-Met i którym nie podawano D-Met, w odniesieniu do zwierząt kontrolnych, nienarażonych na hałas.
3. Porównanie ekspresji genów kodujących syntezę wybranych markerów stresu oksydacyjnego po narażeniu na hałas u myszy, które otrzymywały D-Met i którym nie podawano D-Met, w odniesieniu do zwierząt kontrolnych, nienarażonych na hałas.
4. Wyznaczenie skutecznej dawki D-Met działającej ochronnie w urazie akustycznym u myszy.

Oceniam, że cele pracy zostały wybrane w sposób właściwy a ich realizacja pozwala na uzyskanie bardzo cennych informacji poszerzających aktualną wiedzę na temat ochronnego działania D-Met w urazie akustycznym u myszy (pierwszy etap badań przy ocenie takiego działania u ludzi).

Zgodnie ze schematem prac naukowych następny rozdział to „MATERIAŁ I METODY”. Doktorantka przeprowadziła swoje badania na myszach szczepu C57BL/6, obarczonych recesywną mutacją genu, która warunkuje przyspieszoną utratę słuchu związaną z procesem starzenia się, jak i szczególną podatność tych myszy na uszkodzenie słuchu przez hałas się przyspieszoną utratą słuchu związaną z narażeniem na hałas. Aby zminimalizować różnice w wyjściowych progach słuchu między zwierzętami, analizę przeprowadziła u myszy młodych, 6-tygodniowych. Uważam to za bardzo dobry pomysł, gdyż pozwoliło jej to na zminimalizowanie wpływu procesu starzenia się na wyniki badań, bowiem proces ten zaczyna się u wybranego szczepu już od około 2 - 3 miesiąca życia. Obserwowane przesunięcia

progów słuchu można było zatem interpretować jako zmiany pozostające w związku z narażeniem myszy na hałas.

Doktorantka eksponowała zwierzęta na hałas wąskopasmowy o częstotliwości 4 kHz i poziomie 110 dB przez 8 godzin. D-Met wstrzykiwała zwierzętom dootrzewnowo godzinę przed i 1 godzinę po ekspozycji na hałas (kontrola otrzymywała zastrzyki z soli fizjologicznej). Kolejne takie same dawki D-Met podawane były 2 razy dziennie w tych samych odstępach czasowych 1, 2 i 3 dni po narażeniu. U zwierząt Doktorantka wykonała ocenę zmiany progów słuchu po narażeniu na hałas, ocenę aktywności dysmutaz ponadtlenkowych i katalazy w wypreparowanych (!!!) ślimakach zwierząt po narażeniu na hałas (co wymagało również oznaczanie stężenia białka), ocenę ekspresji genów kodujących wybrane markery stresu oksydacyjnego po narażeniu na hałas (kolejne tego etapy obejmowały: izolację RNA, przeprowadzenie odwrotnej transkrypcji RNA na komplementarne DNA (cDNA) oraz łańcuchową reakcję polimerazy w czasie rzeczywistym (real-time PCR). Jak więc widać zastosowała bardzo nowoczesne metody, pozwalające na publikowanie wyników badań w renomowanych czasopismach międzynarodowych. Metodyka badań jest przedstawiona wyczerpująco i świadczy o profesjonalizmie Doktorantki. Badania były prowadzone w 3 punktach czasowych (1, 7 i 14 dzień po narażeniu na hałas) i dla trzech (lub w przypadku oceny ekspresji genów – dwóch) dawek D-Met (100, 200 i 400 mg/kg). Podziw budzi liczba wykonanych badań – Autorka wykonała je u 289 zwierząt, z czego materiał do badań w części biochemicznej pobrała od 200 myszy, a do badań genetycznych – od 53 myszy. Łącznie zwierzęta były podzielone na 15 podgrup. O ogromie wykonanej pracy świadczy schemat doświadczenia przedstawiony na Rycinie 7. Trzeba uznać, że mimo tej ilości badań, opis grup badanych, warunków ekspozycji i zastosowanych metod jest przedstawiony w sposób klarowny i łatwy do analizy.

Rozdział 4 „WYNIKI” podzielony jest na trzy podrozdziały: „Porównanie zmiany progów słuchu po narażeniu na hałas”, „Ocena aktywności wybranych markerów stresu oksydacyjnego po narażeniu na hałas” i „Ocena ekspresji genów kodujących wybrane markery stresu oksydacyjnego po narażeniu na hałas”. W wyniku badań Autorka stwierdziła, że :

- D-Metionina podawana bezpośrednio przed i w trakcie pierwszych dni po narażeniu na hałas powoduje zależne od dawki, istotne statystycznie, zmniejszenie wielkości przesunięcia progów słuchu. Ochronny efekt na narząd słuchu widoczny był w 7 i 14 dniu po narażeniu, dla D-Met w dawkach 200 i 400 mg/kg masy ciała;

- istotny statystycznie wzrost aktywności dysmutaz ponadtlenkowych w tkankach ucha wewnętrznego w 7 i 14 dniu po ekspozycji. Efekt ten widoczny był jedynie dla najwyższej ze stosowanych dawek D-Met (400 mg/kg masy ciała);
- zahamowanie, obserwowanego u myszy nie otrzymujących D-Met, wzrostu aktywności katalazy w 7 dniu po ekspozycji. Efekt ten widoczny był dla D-Met w dawce 200 i 400 mg/kg masy ciała;
- istotny statystycznie spadek ekspresji genu *Sod1* w 1 dniu po narażeniu oraz jego istotny statystycznie wzrost w 7 dniu po narażeniu, utrzymujący się do 14 dnia po narażeniu. Efekt ten widoczny był jedynie dla D-Met w dawce 400 mg/kg masy ciała;
- istotny statystycznie spadek ekspresji genu *Sod2* w 7 i 14 dniu po narażeniu. Efekt ten widoczny był jedynie dla D-Met w dawce 400 mg/kg masy ciała.

Nieco frustrującą obserwacją było, że D-Metionina podawana bezpośrednio przed i w trakcie pierwszych dni po narażeniu na hałas nie powodowała istotnych statystycznie zmian ekspresji genu *Cat* (mimo wspomnianego wyżej wpływu D-Met na aktywność katalazy). Stwierdzić jednak trzeba, że Doktorantka stwierdziła, równoległą do zmian enzymatycznych, tendencję do zahamowania ekspresji tego genu u zwierząt narażanych na hałas i otrzymujących D-Met w stosunku do zwierząt narażanych na hałas i nieotrzymujących D-Met. W celu potwierdzenia tej obserwacji (uzyskanie istotności statystycznej) konieczne byłoby zapewne zwiększenie liczby zwierząt doświadczalnych (co zresztą również stwierdziła Doktorantka w DYSKUSJI).

Dyskusja wyników zawarta jest w 10. stronicowym rozdziale 5. W pierwszej jego części (ponad 4,5 strony) Doktorantka jeszcze raz przedstawiła uzasadnienie podjęcia badań nad D-metioniną. Oparła je na powszechnie aprobowanej hipotezie, o kluczowej roli stresu oksydacyjnego w rozwoju uszkodzeń słuchu spowodowanych hałasem. W związku z tym, wysoce prawdopodobna wydaje się możliwość opracowania strategii terapeutycznej ochrony przed uszkodzeniami słuchu opartej na utrzymaniu równowagi pomiędzy nadmiernym stężeniem reaktywnych form tlenu i azotu a zdolnością do ich detoksykacji. Pomocne w tym zakresie mogą być egzogenne substancje antyoksydacyjne tzw. antyoksydanty, do których należy D-metionina. Wybór D-Met uzasadniony był wieloma względami, w szczególności zaś wcześniejszymi badaniami na modelach zwierzęcych, których wyniki były na tyle obiecujące, że uzasadniały rozpoczęcie badań klinicznych u ludzi. Dodatkowo, atrakcyjność badań nad D-Met zwiększa fakt, że w przeciwieństwie do większości pozostałych antyoksydantów jest ona, poza witaminami, składnikiem diety, stąd łatwo można byłoby ją suplementować u ludzi. W

pierwszej kolejności w dyskusji Doktorantka szczegółowo przedstawiła informacje o dotychczas wykonanych na świecie badaniach nad tym związkiem (znaczący wkład do nich wniósł zespół z IMP, którym kieruje promotor pracy doktorskiej prof. dr hab. med. Mariola Śliwińska-Kowalska). W dalszej kolejności przedstawiła, na tle doniesień literaturowych, argumenty za przyjęciem do badań: modelu mysiego, stosowanych przez siebie parametrów hałasu, testowanych dawek D-Met oraz wyboru punktów czasowych do oceny wpływu D-Met na procesy stresu oksydacyjnego zachodzące w uchu wewnętrznym myszy. Zastanawiam się, czy cały ten fragment nie powinien znaleźć się we WPROWADZENIU.

Właściwa dyskusja wyników podzielona jest na trzy części, zatytułowane: „Zmiany progów słuchu po narażeniu na hałas”, „Ocena aktywności wybranych markerów stresu oksydacyjnego” oraz „Ocena ekspresji genów kodujących wybrane markery stresu oksydacyjnego”. Jest przeprowadzona z dużą znajomością innych, zarówno polskich (IMP) jak i zagranicznych badań dotyczących tych zagadnień. W większości przypadków wyniki badań własnych Doktorantki są zgodne z badaniami wcześniejszymi, a ewentualne różnice Doktoranta potrafiła przekonywująco uzasadnić. Szczególną uwagę zwraca ostatnia część dyskusji dotycząca badań ekspresji genów. Są to badania pionierskie w skali światowej. Ich wyniki są ogromnie interesujące i pozwoliły Doktorantce zbudować spójną, ciekawą hipotezę wyjaśniającą działanie ochronne D-Met.

Po przeanalizowaniu badań wykonanych przez mgr Wolniakowską i ich wyników, stwierdzam, że włożyła ona swój znaczący wkład w rozpoznanie molekularnych mechanizmów ochronnego wpływu antyoksydantów, zwłaszcza D-Met, na narząd słuchu myszy w urazie akustycznym, a uzyskane przez nią wyniki mogą być pomocne w dalszych badaniach klinicznych z zastosowaniem D-Met w profilaktyce uszkodzeń słuchu spowodowanych hałasem.

Ostatni – 6 rozdział rozprawy zawiera „Podsumowanie i wnioski”. Sześć punktów podsumowania w klarowny i skondensowany sposób przedstawiają uzyskane wyniki, a wnioski dotyczące głównie mechanizmu molekularnego są uzasadnione.

Spis piśmiennictwa (rozdział 7) składa się ze 186 pozycji, powstałych od lat 90. XX wieku, aż do roku 2018 i zawiera dane bibliograficzne prac dotyczących zarówno uszkodzeń słuchu jak i związanych z nimi procesów oksydacyjnych. Dobór piśmiennictwa świadczy o dogłębnych studiach literaturowych Doktorantki.

Praca została przygotowana w sposób bardzo staranny, ma interesującą oprawę graficzną, schemat badań i wykresy dobrze ilustrują ich przebieg i wyniki. Nieliczne

wątpliwości rodzące się przy czytaniu pracy, o których była mowa wyżej, nie wpływają na ogólną bardzo wysoką ocenę pracy.

Podsumowując należy stwierdzić, że rozprawa pt. „*Ocena ochronnego działania D-metioniny na narząd słuchu w urazie akustycznym*” przygotowana przez mgr Annę Wolniakowską, spełnia wymagania Ustawy o stopniach naukowych i tytułach naukowych, która stwierdza że rozprawa doktorska powinna stanowić oryginalne rozwiązanie problemu naukowego oraz wykazywać ogólną wiedzę teoretyczną kandydata w danej dziedzinie naukowej, a także umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. W związku z tym mam zaszczyt przedstawić Wysokiej Radzie Naukowej Instytutu Medycyny Pracy im. dr. Jerzego Nofera wniosek o dopuszczenie mgr Anny Wolniakowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie, z uwagi na wspomnianą wyżej bardzo wysoką, w mojej ocenie, wartość merytoryczną recenzowanej pracy, wnioskuję do Wysokiej Rady o jej wyróżnienie.

KIEROWNIK ZAKŁADU  
Ochrony Radiologicznej  
prof. dr hab. Marek Zmyślony