

dr hab. Robert Stawarz, prof. uczelni
Uniwersytet Pedagogiczny w Krakowie
Instytut Biologii i Nauk o Ziemi
Katedra Zoologii
30-084 Kraków
ul. Podchorążych 2

Kraków 2023-05-07

Recenzja

rozprawy doktorskiej na stopień doktora nauk biologicznych Pana mgr Rafała Bilskiego pt. **Wpływ pierwiastków chemicznych i wybranych wariantów polimorfizmu genów u chorych z zeszywniającym zapaleniem stawów kręgosłupa**, napisanej pod kierunkiem dr hab. Piotra Kamińskiego, prof. nadzw.

Rozprawa ma objętość 277 stron i jest podzielona na 15 głównych rozdziałów. Celem podjętych przez doktoranta badań było określenie związków pomiędzy wybranymi uwarunkowaniami środowiskowymi a występowaniem choroby o podłożu autoimmunologicznym: zeszywniającego zapalenia stawów kręgosłupa. Główną przesłanką do podjęcia pracy jest niekompletnie poznany patomechanizm tej choroby. Czynniki środowiskowe mogą w istotny sposób korelować z rozwojem choroby poprzez wpływ na funkcjonowanie bariery antyoksydacyjnej organizmu, proces utleniania lipidów a także poprzez wpływ na zawartości pierwiastków chemicznych zarówno biogenych jak i ksenobiotycznych. Wybór tematu jest dobrze uzasadniony, a zakładane istnienie korelacji pomiędzy wskazanymi uwarunkowaniami środowiskowymi i wybranymi parametrami fizjologicznymi stanowi solidną podstawę głównej hipotezy badawczej, co jest bezwzględnym wymogiem każdej pracy naukowej.

Konstrukcja dysertacji jest prawidłowa; poszczególne rozdziały główne są bardzo obszerne i podzielone na szereg podrozdziałów. Opisano syntetycznie rozpoznanie, patogenezę i przebieg ZZSK, co w odniesieniu do tematyki badań jest celowe i ułatwia zrozumienie wyników i analiz statystycznych zamieszczonych w dalszej części pracy. Rozdział 3 jest poświęcony udziałowi czynników środowiskowych w przebiegu i rozwoju ZZSK, do których autor zaliczył występujące w środowisku pierwiastki chemiczne dzieląc je słusznie na makroelementy i mikroelementy, ale osobno traktując toksyczne metale ciężkie, które

przecież również znajdują się w grupie „pierwiastki chemiczne”. Sam autor zresztą zauważa w dalszej części dysertacji, że: „Kwalifikacja pierwiastków na trzy grupy: makroelementy, mikroelementy i metale ciężkie, w zależności od ich stężenia w organizmie jest dość umowna” i dlatego można było przedstawić ją w sposób bardziej nowoczesny. Z kolei podrozdział „Obrona antyoksydacyjna” traktuje o wewnętrznych mechanizmach fizjologicznych organizmu i dlatego nie powinien znajdować się w tym miejscu; aktywność antyoksydacyjna jest bowiem między innymi efektem działania czynników środowiskowych.

W rozdziale 5 doktorant opisuje udział czynników genetycznych w przebiegu i rozwoju ZZSK omawiając polimorfizm genu CTLA4, STAT4, COL1A1, PTPN22. Merytoryczna zawartość poszczególnych podrozdziałów nie budzi zastrzeżeń, jednak można tu znaleźć kilka językowych zawiłości, o wyjaśnienie których proszę autora. Jak mianowicie należy rozumieć pojęcie „ekspresji białka”? Czytamy: „Polimorfizm w obrębie genu kodującego CTLA4 może przyczynić się do zmniejszonej ekspresji tego białka” Czy chodzi o zmienioną aktywność białka czy chodzi o zmianę ekspresji genu, w wyniku której powstaje inne, mniej/bardziej aktywne białko? (s. 50). Czy możemy mówić o „ekspresji cytokin” (s. 51), czy może lepiej mówić o aktywności cytokin? Słowo ekspresja jest właściwe dla genu: ekspresja genu białka, skutkiem ekspresji genu jest powstanie białka itd. Podobnie mam wątpliwości do określenia „ekspresja komórek” – proszę o wyjaśnienie na czym polega według autora pracy ekspresja komórek CD4+ i CD8+; czy chodzi o zmiany ich aktywności czy zmiany ich ilości. Rozumiem, że najprawdopodobniej autor używa słowa ekspresja tłumacząc je bezpośrednio z angielskiego expression: w języku polskim w odniesieniu do pojęć genetycznych stosuje się bardziej precyzyjne określenia.

Z kolei na stronie 55 czytamy, że „Polimorfizm pojedynczego nukleotydu doprowadza do zmiany argininy w tryptofan” – należałoby napisać „zamiany argininy na tryptofan” ponieważ nie dochodzi do przekształcenia jednej substancji w drugą a zastąpienia, „podmienienia” jednej substancji przez drugą.

Cele badań autor sformułował w rozdziale o tym samym tytule w postaci zadań typu: określenie zależności, ocena wpływu, analiza molekularna, zbadanie wpływu. Nie znajdziemy tu klasycznie postawionej hipotezy ani hipotez, które autor zamierza falsyfikować. Celem pracy naukowej jest weryfikacja hipotez i powinny być one wyraźnie sformułowane: to co autor przedstawił w rozdziale „Cele badań” pozwala jednak dostrzec hipotezy: w odniesieniu do punktu 1 mogłaby ona wyglądać tak: Istnieje związek pomiędzy zawartością pierwiastków biogennych i ksenobiotycznych a przebiegiem zesztywniającego zapalenia stawów kręgosłupa.

W punkcie 2 autor w zasadzie pisze o zbieraniu danych dotyczących funkcjonowania mechanizmów antyoksydacyjnych, intensywności peroksydacji lipidów, które mają posłużyć weryfikacji hipotezy mówiącej, że istnieją różnice dotyczące funkcjonowania antyoksydacyjnych mechanizmów obronnych i intensywności peroksydacji lipidów w surowicy krwi pomiędzy ludźmi chorymi na ZZSK a zdrowymi, itd.

Badaniami objęto chorych nie tylko na ZZSK lecz także RZS i ŁZS uzasadniając to faktem zbliżonej charakterystyki i etiologii tych chorób, przy czym największą grupę stanowili pacjenci ze zdiagnozowanym RZS (n=111). Grupa kontrolna została prawidłowo dobrana i liczyła 72 osoby pochodzące z regionów analizowanych względem rejonizacji chorych. Dalej jednak czytamy, że „Dodatkowo w kontroli z terenów czystych, n=228”. Czy oznacza to, że były dwie grupy kontrolne?

Metody badań zostały generalnie dobrze opisane i nie budzą zastrzeżeń. Są nowoczesne i prawidłowo dobrane. Nie budzą również zastrzeżeń zastosowane procedury statystyczne. Wyniki badań zostały szeroko opisane, zestawione w tabelach i zilustrowane na wykresach. W poszczególnych podrozdziałach „Wyników badań” autor formułuje bieżące wnioski, które podkreślają istotne dla ZZSK fakty, co ważne – na tle danych dotyczących RZS i ŁZS. Ważne są spostrzeżenia dotyczące zachorowalności w odniesieniu do płci (mężczyźni chorują częściej), wieku (jest to choroba ludzi w średnim wieku), czy dane na temat wieku rozpoznania choroby; niepokojący jest fakt, że ZZSK jest diagnozowane dopiero po około 7 latach trwania choroby. Bardzo ważny w tym świetle jest wniosek odnoszący się do niewielkich możliwości diagnostycznych w zakresie chorób reumatoidalnych, co dodatkowo wzmacnia celowość podejmowania badań nad tymi chorobami w tym ZZSK, a jednocześnie podnosi jeszcze bardziej wartość niniejszej pracy.

Intrygujące są niektóre zestawienia, jak chociażby te, które wskazują na duży odsetek chorych wśród osób ze średnim wykształceniem w dużych miastach. Czy rzeczywiście wynika to z narażenia będącego konsekwencją częstszej pracy fizycznej tych osób? Jak łatwo zauważyć w dalszej części dysertacji autor posiada dane dotyczące wykonywanej pracy w badanych grupach. Czy aktywność fizyczna (w tym praca fizyczna) stanowi zagrożenie w kontekście narażenia na ZZSK? Zdecydowana większość pacjentów podaje, że nie podlegała w żadnym stopniu narażeniu na czynniki szkodliwe (o jakie dokładnie czynniki szkodliwe byli pytani pacjenci?). Odnosząc się do nawyków żywieniowych doktorant zauważa, że wśród cierpiących na choroby reumatoidalne prawie nie było wegetarian. To ciekawe spostrzeżenie, jak sądzę

godne uwagi z pewnością warto jest dalszych badań – czy autorowi znane są jakieś doniesienia naukowe, w których poddaje się analizie związku diety wegetariańskiej z występowaniem chorób reumatoidalnych? Za niezwykle ciekawe uważam dane dotyczące zawartości pierwiastków u ludzi chorych na ZZSK. Autor zwraca uwagę na to, że średnie zawartości pierwiastków wykraczają poza granice wartości referencyjnych. To ważne odkrycie. Bardzo duże odchylenie standardowe średniej zawartości pierwiastków jest dobrze znanym przez badaczy faktem: jest ono charakterystyczne dla wielu tkanek zarówno ludzkich jak i zwierzęcych.

Zrozumienie ogromu uzyskanych wyników ułatwia rozdział „Podsumowanie wyników”. W bardzo jasny sposób przedstawione zostały najważniejsze fakty naukowe będące efektem przeprowadzonych badań. Tu także znajdziemy liczne wnioski.

Dyskusja jest bardzo obszerna, krytyczna i wyważona, dokonana na tle danych literatury naukowej. Niektóre stwierdzenia autora mogą wydawać się ryzykowne. Czytamy np., że „Aktywność CAT, GPx i GR jest wyższa u chorych z Bydgoszczy, niż z Grudziądza (...). Może to wynikać z większego narażenia na stres oksydacyjny u chorych z Bydgoszczy, ze względu na wielkość miasta jak i potencjalny poziom zanieczyszczeń środowiskowych, dzięki czemu bariera antyoksydacyjna jest stymulowana do działania.” Kiedy spojrzymy na dane statystyczne tych miast charakteryzują się one faktycznie różnicą liczby ludności, ale gęstość zaludnienia jest podobna (Bydgoszcz: 1875 osób/km², Grudziądz: 1547 osób/km²) – ludzie żyją zatem w podobnych warunkach. Dane z dnia 5 maja 2023 zaczerpnięte ze strony <https://powietrze.gios.gov.pl> pokazują przykładowo dla Grudziądza: stężenia PM10: 23,7 µg/m³, NO₂: 20,9 µg/m³, CO: 0,4 µg/m³ i dla Bydgoszczy: stężenia PM10: 15,5 µg/m³, NO₂ 14,5 µg/m³, CO 0,3 µg/m³; a więc biorąc pod uwagę te dane to w Grudziądzu mamy gorszy stan środowiska. Oczywiście nie bronię tezy, że stwierdzenie autora jest błędne, bo trzeba byłoby prześledzić dane z dłuższych okresów. Zwracam tylko uwagę na konieczność dużej ostrożności we wnioskowaniu.

Konkluzja

O tym czy cele pracy zostały osiągnięte świadczą sformułowane na podstawie wyników i ich analiz statystycznych wnioski. Nie ma wątpliwości, że autor osiągnął wszystkie zakładane cele a mianowicie:

1. Określił zależności pomiędzy zawartościami wybranych pierwiastków chemicznych we krwi z zaburzeniami w przebiegu zeszywniającego zapalenia stawów kręgosłupa. Stwierdził, że wysokie stężenia pierwiastków toksycznych (Pb, Cd, As) mogą przyczyniać się do zaburzenia gospodarki magnezem, wapniem i fosforem, co prowadzi do dysfunkcji procesów w układzie kostno-stawowym u chorych z ZZSK, nasilając reakcję zapalną.
2. Oceniał wpływ patologicznych zmian wywołanych stresem oksydacyjnym na funkcjonowanie antyoksydacyjnych mechanizmów obronnych, białka ostrej fazy oraz zbadanie intensywności peroksydacji lipidów w surowicy chorych i zdrowych, ponieważ udowodnił że wzmożona aktywność bariery antyoksydacyjnej jest spowodowana nadprodukcją wolnych rodników tlenowych, które poprzez zdolność do niszczenia struktur kostno-stawowych mogą prowadzić do utraty ich biologicznej funkcji u osób z ZZSK oraz, że wysokie stężenie CP u chorych na ZZSK jest związane z wystąpieniem i nasileniem procesu zapalnego.
3. Podał szczegółowej i wnikliwej analizie molekularnej polimorfizmy wybranych genów i ustalił, że nie mają one bezpośredniego związku z występowaniem ZZSK w badanej populacji.
4. Udowodnił, że stosowanie używek, nieprawidłowa dieta i narażenie na czynniki zawodowe, mogą wpływać na zaburzenie równowagi pierwiastkowej organizmu i prowadzić do akumulacji substancji o charakterze toksycznym u chorych na ZZSK.
5. Określił wzajemne relacje pomiędzy stężeniem pierwiastków chemicznych, zdolnościami obronnymi organizmu i zmianami polimorficznymi w genach u chorych na zeszywniające zapalenie stawów kręgosłupa.

Wobec powyższego stwierdzam, że przedstawiona do oceny praca Pana mgr Rafała Bilskiego spełnia wymagania określone w art. 13.1 Ustawy z dnia 14 marca 2013 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. nr 65 poz. 595 z późn. zmianami). Wniosuję do Rady Naukowej o dopuszczenie Pana magistra do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Biorąc pod uwagę fakt ogromu wykonanej pracy, podjęcia nowatorskiego kierunku badań nad ZZSK, istotnego przyrostu wiedzy w reprezentowanej dyscyplinie wniosuję do Wysockiej Rady o wyróżnienie pracy.