

Dr hab. Agnieszka Noszczyk-Nowak, prof. nadzw.

Wrocław, 18.07.2017 r.

Katedra Chorób Wewnętrznych

z Kliniką Koni, Psów i Kotów

Wydziału Medycyny Weterynaryjnej

Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu

OCENA

rozprawy doktorskiej mgr inż. Ewy Klepacz pt. „Naturalne polifenole i ich glikozydy jako związki kompleksujące jony wapnia i ich potencjalne zastosowanie w terapii kamicy nerkowej.”

Kamica nerkowa jest jedną z najczęstszych chorób układu moczowo-płciowego. Chorzy cierpiący z powodu kolki nerkowej są codziennie wśród osób wymagających konsultacji urologicznych w szpitalnych oddziałach ratunkowych. Choroba ta dotyczy około 2-3 razy częściej mężczyzn niż kobiet. Wśród głównych przyczyn kamicy wymieni się zbyt małą ilość wypijanych płynów, szczególnie w okresie zwiększonego zapotrzebowania, jak wysiłek fizyczny, upał, gorączka, biegunka czy wymioty, dietę bogatą w białko i minerały, czy niektóre leki. Zaburzenia w odpływie moczu i jego zastój w obrębie dróg moczowych ważne czynniki predysponujące do kamicy moczowej, podobnie jak zakażenia. Dotyczy to zarówno wad anatomicznych wrodzonych (np. zwężenie przejścia miedniczkowo-moczowodowego), jak i nabytych w wyniku urazów, schorzeń współistniejących, operacji w obrębie układu moczowego. Wady genetyczne zaburzające gospodarkę jonowo-metaboliczną także mogą być przyczyną kamicy, dlatego często można obserwować rodzinne występowanie kamicy. W zależności od wielkości złogu, jego lokalizacji, składu chemicznego i czynników zależnych od pacjenta (np. ciąża, choroby współistniejące, warunki anatomiczne) lekarz decyduje o wyborze leczenia: zachowawczego lub operacyjnego. Leczenie zachowawcze polega na podawaniu leków i podejmowaniu działań nieoperacyjnych mających na celu zniesienie objawów kolki nerkowej, samodzielne wydalenie złogu lub jego rozpuszczenie, dlatego temat podjęty przez doktorantkę uważam za aktualny i niezwykle ważny.

Rozprawa doktorska mgr inż. Ewy Klepacz przedstawiona w postaci wydruku komputerowego (213 stron + załączniki), nie ma typowego układu dla tego typu prac, nie została też zaopatrzona w streszczenie w języku polskim i angielskim. Po spisie treści od razu jako pierwszy rozdział przedstawione są założenia i cele pracy doktorskiej. W tym rozdziale

Doktorantka przedstawia również informacje na temat kamicy nerkowej, aktualnych metod jej leczenia oraz roli surowców roślinnych profilaktyce kamicy nerkowej. Na stronie 8 tego rozdziału Doktorantka używa skrótów ESWL, URSL i PCNL, których nie wyjaśnia. Kruszenie kamieni wewnątrzustrojową falą ultradźwiękową (ESWL, ang. extracorporeal shock wave lithotripsy) jest najmniej inwazyjną metodą leczenia kamicy moczowej. URSL czyli uretroskopia tj. wziernikowanie moczowodu i układu kielichowo-miedniczkowego nie jest *stricto* metodą leczenia, ale wykonana z użyciem dodatkowego sprzętu kruszącego i ewakuującego złogi pozwala na usunięcie prawie każdego złogu z moczowodu i nerki. Przeskórna nefrolitotrypsja (PCNL, ang. percutaneous nephro-lithotomy) to druga metoda endoskopowa leczenia kamicy zlokalizowanej w kielichach, miedniczce i początkowym odcinku moczowodu, szczególnie gdy lokalizacja lub wielkość złogu dyskwalifikuje go z metody ESWL lub pacjent nie wyraża zgody na ten zabieg. Cele pracy, zawarte w tym rozdziale, zostały poprawnie określone, jednak byłby bardziej czytelne, gdyby zostały sformułowane w postaci podpunktów.

W obszernym, 73-stronicowym wstępie (część teoretyczna), Doktorantka omawia szczegółowo polifenole zarówno pod względem chemicznym, jaki i ich aktywności biologicznej. Następnie mgr inż. Ewa Klepacz omawia rolę jonów metali w organizmie. Ten fragment wydaje się być zbędny, gdyż na 2 stronach nie sposób jest omówić tej roli i w efekcie Doktorantka jedynie prześlizguje się po temacie, czasem popełniając błędy w sformułowaniach np. str. 14 „Jony sodu wraz z jonami potasu odpowiadają za napięcie mięśniowe (w tym serca)”. Serce oczywiście zbudowane z komórek mięśnia poprzecznie prążkowanego, jednak tworzącego syncytium komórkowe. W stosunku do mięśnia sercowego nie używa się sformułowania „napięcie mięśniowe”, a jony sodu i potasu wraz z jonami wapnia odgrywają kluczową rolę w przewodzeniu pobudzenia, a następnie synchronicznym skurczu obu przedsionków, a następnie obu komór serca. Nie używa się także określenia „poziom”, tylko „stężenie” jonów wapnia (str. 15). Rozumiem, że jest to konsekwencja dużej ilości literatury anglojęzycznej, gdzie często w tekście funkcjonuje słowo „level”, jednak nie można słowa tego tłumaczyć na język polski jako „poziom”. W kolejnej części Doktorantka szczegółowo omawia zdolności jonów metali do tworzenia związków kompleksowych, opisy opatrząc rycinami, co mi – jako osobie o wykształceniu lekarsko-weterynaryjnym a nie chemicznym- bardzo ułatwiło czytanie tego rozdziału. Ostatni akapit ze str. 25, a także ostatni akapit ze str. 36 powinny znaleźć się w omówieniu wyników

uzyskanych przez mgr inż. Ewę Klepacz. Doktorantka sprawnie porusza się po tematyce polifenoli, ich właściwości do tworzenia związków kompleksowych oraz możliwości wykorzystania tej cechy w leczeniu kamicy. W kolejnym rozdziale wstępu doktorantka omawia 7 roślin, które ze względu na dużą zawartość substancji aktywnej mogą być użyteczne w terapii układu moczowego. Ostatnią częścią wstępu jest opis kamicy nerkowej jako choroby oraz metod jej leczenia, co dla Doktorantki „nie-lekarza” nie było łatwym przedsięwzięciem. Wiele informacji znalazło się już wcześniej w rozdziale „Założenia i cele pracy”. Zbędny wydaje się szeroki opis metod inwazyjnych. Podsumowując, obszerny 73-stronicowy wstęp pokazuje, że Doktorantka widzi problem kamicy nerkowej szeroko. Biegłość Doktorantki w temacie jest widoczna m.in. poprzez zacytowanie aż 220 pozycji piśmiennictwa. Niestety sprawdzenie poprawności wyboru zacytowanych pozycji jest mocno utrudnione poprzez brak tytułów publikacji w spisie literatury (rozdział 12).

Kolejna część pracy zatytułowana jest jako „Część doświadczalna”. Nie jest to typowy rozdział „Materiały i metody”, jednak informacje zawarte w tym rozdziale dotyczą właśnie metodyki. Znalazły się tu również wyniki wraz z ich omówieniem. Doktorantka opisuje metody, jakimi otrzymywała preparaty roślinne oraz ich ilość: metodą I z użyciem ekstrakcji surowca roślinnego nad chłodnicą zwrotną w warunkach refluku uzyskała 5 preparatów, metodą II z użyciem ekstrakcji ciągłej w aparacie Soxhelta uzyskała 3 preparaty, metodą III zaparzania wrzątkiem uzyskała 1 preparat, metodą IV z użyciem ekstrakcji surowca roślinnego wodą w warunkach refluku uzyskano 2 preparaty, metodą V z użyciem ekstrakcji surowca roślinnego metanolem w warunkach refluku uzyskano 2 preparaty, metodą VI i VII z wykorzystaniem maceracji materiału roślinnego wodnym roztworem wodorotlenku glinu uzyskała 7 preparatów (3 metodą VI, 4 metodą VII), metodą VIII z wykorzystaniem ekstrakcji ditlenkiem węgla w stanie nadkrytycznym uzyskała 1 preparat. Uzyskane preparaty zostały poddane ocenie właściwości kompleksujących jony wapnia. Największą efektywność w zakresie inhibicji powstawania szczawianu wapnia, ocenioną metodą miareczkowania konduktometrycznego, wykazywały preparaty z ortosyfonu groniastego. Największą efektywność w zakresie inhibicji powstawania szczawianu wapnia, która została oceniona metodą fotometrii płomieniowej, wykazywały preparaty uzyskane metodą VI i VII, a zwłaszcza preparat z ortosyfonu groniastego i preparaty z rdestu ptasiego. Najbardziej aktywnym preparatem w zakresie redukcji rozmiaru kryształów szczawianu wapnia okazał się roztwór wodny z żurawiny wielkoowocowej uzyskany metodą V. W przypadku oceny

korelacji analizy mikroskopowej z analizą rozpuszczalności szczawianu wapnia metodą absorpcyjnej spektroskopii atomowej oraz korelacji składu chemicznego z aktywnością inhibicji powstawania szczawianu wapnia nie podano jakimi testami statystycznymi analizowano te korelacje.

Bardzo cenne jest, że Doktorantka oprócz opracowania i optymalizacji metod izolowania preparatów roślinnych i ich szczegółowej analizy chemicznej różnymi metodami, pojęła się weryfikacji właściwości biologicznych uzyskanych preparatów. Bardzo wartościowa jest ocena cytotoksyczności 7 wybranych preparatów na linii komórkowej HEK-293 tj. linii komórkowej wyprowadzonej z embrionalnych komórek nerki człowieka, poprzedzająca badania na zwierzętach. Z tej części badań wyłynął bardzo ważny wniosek dotyczący ograniczonej przydatności metody ekstrakcji materiału roślinnego ditlenkiem węgla w stanie nadkrytycznym w przemyśle farmaceutycznym. Badania przeprowadzone na szczurach miały za zadanie zweryfikować wstępną selekcję uzyskanych preparatów pod kątem ich potencjalnego wykorzystania w przyszłości do wspomagania leczenia kamicy nerkowej z udziałem szczawianów wapnia. Niestety przyjęty układ pracy bardzo utrudnia ocenę poprawności metodyki, zwłaszcza części doświadczalnej, gdyż informacje dotyczące materiału badawczego, metodyki, uzyskanych wyników oraz ich omówienie znajdują się w różnych miejscach tego rozdziału. Nie znalazłam informacji dotyczącej ilości wszystkich szczurów wykorzystanych w doświadczeniu, liczebności poszczególny grup szczurów w doświadczeniu (kontrolnych, z kamicą wywołaną metodą I, II oraz III), rozkładu płci, sposobu obierania moczu od zwierząt, czasu trwania doświadczenia oraz czy użyty preparaty żurawiny wielkoowocowej był tym samym, który nie wykazał cytotoksyczności w badaniach na linii komórkowej HEK-293. Opis sposobu podawania badanych substancji jest również lakoniczny. Preparatów zawierających żurawię na rynku jest wiele, dlaczego Doktorantka wybrała właśnie ekstrakt z tej rośliny, mając do dyspozycji tyle innych? Wyniki stężenia badanych związków w grupie szczurów bez kamicy nerkowej, przedstawione na wykresach 57-59, zawierają jedynie informację o średnim stężeniu substancji w moczu, bez odchylenia standardowego. Nie wiadomo też czy jest to średnie stężenia uzyskane u jednego szczura czy też od grupy szczurów. W takiej formie przedstawione wyniki są trudne do interpretacji. Zwłaszcza w świetle informacji ze str. 168 o wyraźnym wzroście stężenia substancji i str. 170, że „Wahań w wynikach stężeń związków oznaczanych metodą Lamaison-Carnat jest znacznie mniej niż przy pomiarach stężeń w metodzie FC” (słowo wachania rozumiem jako odchylenie

standardowe). Brak rozdziału „Analiza statystyczna” również utrudnia interpretację uzyskanych przez Doktorantkę wyników. Nie wiadomo bowiem czy różnice np. uzyskanych stężeń, opisywane przez Doktorantkę uzyskały istotność statystyczną. Nie wiadomo również które grupy i o jakiej liczebności zostały porównane ze sobą. W kolejnej części tego rozdziału mgr inż. Ewa Klepacz potwierdza badaniem ultrasonograficznym wyidukowanie kamicy nerkowej. Niestety na wydruki z USG zostały naniesione znaczki w postaci czerwonych okręgów, znacznie zaciemniających uzyskane obrazy ultrasonograficzne. Na ryc. 61 uniemożliwiają one dokładną ocenę złogów poddanych pomiarowi. Wiele z zeskanowanych wydruków USG jest złej jakości. Czerwone znaczki należy zamienić na strzałki z wąskim grotem lub pozostawiać zdjęcia z USG bez dodatkowych oznaczeń, ponieważ złogi są dobrze widoczne. W ostatecznej publikacji należy użyć zapisów cyfrowych i nie powiększać ich, bo prowadzi to istotnej utraty jakości obrazów ultrasonograficznych. Na stronie 173, 174 i 175 Doktoranta omawiając skuteczność trzech metod wywołania kamicy nerkowej zauważa np., że u 50% zwierząt złogi miały charakter piasku. Jednak bez podania liczby zwierząt, u której indukowano kamicy nerkową daną metodą informacja ta jest zupełnie bezwartościowa. Proszę również o podanie ile szczurów miało podawany badany preparat po indukcji kamieni nerkowych metodą I, II i III z podziałem na płeć zwierząt. Na wykresie 69 i 70 podane jest stężenie wapnia w moczu w różnych dniach eksperymentu. Czy jest to średnia stężenie wapnia dla badanej grupy czy stężenie wapnia uzyskane u konkretnego szczura? Zabrakło mi również w tej części dysertacji informacji dotyczącej różnic oraz zalet preparatu otrzymanego przez mgr inż. Ewę Klepacz w porównaniu z preparatami żurawiny, dostępnymi na rynku.

W tak obszernej dysertacji Doktorantka nie ustrzegła się drobnych błędów, literówek oraz braku źródła cytowanych informacji:

- brak jest wykazu używanych skrótów
- brak numery zgody Lokalnej Komisji Etycznej
- brak informacji czy szczury były znieczulane do badanie ultrasonograficznego, jeśli tak to w jaki sposób
- str. 8, linia 6, brak źródła cytowanej informacji, dotyczącej wzrostu odsetka chorych na kamicy nerkową w ostatnich latach
- str. 170, linia 3-4 jest „metodzie LC” powinno być „metodzie FC”

- str. 171, linia 4, brak źródła „poprzednich wyników”, do których odwołuje się Doktorantka; nie wiadomo też czy chodzi o dane z piśmiennictwa czy przeprowadzone przez Doktorantkę badania własne
- strona 171, akapit 2 – zdanie pierwsze wymaga przeredagowania
- str. 174, lina 1 oraz str. 182 linia 3 brak informacji o jaki efekt cytotoksyczny chodzi
- str. 177, linia 1, brak jednostki
- str. 177, lina 7 brak źródła cytowanej informacji
- str. 179, ryc. 65 brak informacji o odstępie czasowym wykonanych badań USG.
- str. 181, linia 3-4 „Wydłużenie czasu podawania preparatu mogłoby doprowadzić do całkowitego rozpuszczenia złogów szczawianu wapnia” jest domniemaniem, ponieważ Doktorantka nie przeprowadziła badań w tym kierunku

Szczególnie dokładnie należy przeredagować bardzo obszerny spis piśmiennictwa (str. od 196, 244 pozycji). Należy dodać pełne tytuły cytowanych publikacji, uzupełnić strony (poz. 13, 74, 209, 214, 219). Strony typu www.doz.pl nie stanowią autoryzowanej informacji o lekach i suplementach diety. W celu uzyskania takiej informacji należy sięgnąć do Farmakopei Polskiej wydawanej przez Urząd Rejestracji Produktów Leczniczych, Wyrobów Medycznych i Produktów Biobójczych lub do informacji dołączonych do produktu przez producenta suplementu diety, które są dopuszczone do obrotu przez Głównego Inspektora Sanitarnego.

Przeredagowania wymagają wnioski. Wydaje się celowe umieszczenie je w rozdziale „Wnioski”, a nie „Podsumowanie” i istotne ich skrócenie. Pozycje 2 i 3 nie są wnioskami wynikającymi z pracy, pozycje 3, 5, 10, 13 i 16 są częścią wyników, zabrakło za to ważnego wniosku dotyczącego ograniczonej przydatności metody ekstrakcji materiału roślinnego ditlenkiem węgla w stanie nadkrytycznym w przemyśle farmaceutycznym, który został zawarty w pierwszym akapicie na stronie 167.


Analiza ograniczeń metodologicznych i technicznych pracy zawarta stanowiłaby cenne uzupełnienie dysertacji.

W podsumowaniu mojej opinii doceniam przygotowanie teoretyczne Doktorantki, umiejętność postawienia problemu badawczego i jego realizacji, sposób przeprowadzenia

badań oraz użycie nowoczesnych metod badawczych. Na podkreślenie zasługuje interdyscyplinarny charakter pracy. Przedstawienie wyników i ich interpretacja dowodzi znajomości przedmiotu badań oraz dojrzałości Doktorantki jak adeptki pracy naukowej. Jak każda praca, również przedstawiona do recenzji dysertacja nie ustrzegła się przed pojedynczymi pomyłkami, nie wpływającymi na jej wartość naukową. Uwagi zawarte w niniejszej recenzji mają charakter porządkowy i mogą jedynie podnieść wartość merytoryczną dysertacji. Należy je uwzględnić podczas ostatecznego redagowania pracy do druku.

Rozprawa doktorska mgr inż. Ewy Klepacz „Naturalne polifenole i ich glikozydy jako związki kompleksujące jony wapnia i ich potencjalne zastosowanie w terapii kamicy nerkowej” spełnia w mojej ocenie wymogi stawiane rozprawom na stopień doktora nauk chemicznych określone w art. 13 ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule naukowym w zakresie sztuki z dnia 14 marca 2003 roku (Dz. U. Nr 64, poz. 595, ze zm.). Na tej podstawie przedstawiam Wysokiej Radzie Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej wniosek o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Z poważaniem



dr hab. Agnieszka Noszczyk-Nowak, prof. nadzw.