

dr hab. Barbara Poniedziałek  
Zakład Medycyny Środowiskowej  
Uniwersytet Medyczny  
im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Poznań, 14 sierpnia 2019 r.

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr inż. Katarzyny Czerniak**  
**pt. "Wpływ anestetyków lokalnych na produkcję reaktywnych form tlenu i azotu**  
**w granulocytach obojętnochłonnych krwi pępowinowej**  
**w warunkach hipoksji-reoksygenacji *in vitro*"**

Niedotlenienie okołoporodowe jest zespołem objawów wynikającym z hipoksji płodu i w zależności od stopnia nasilenia i czasu trwania może prowadzić do poważnych skutków klinicznych, w tym nieodwracalnego uszkodzenia układu nerwowego i zgonu. Jak wykazano na drodze modeli doświadczalnych, zarówno *in vitro* jak i *in vivo*, procesy hipoksji-reoksygenacji mogą prowadzić do szeregu niekorzystnych zmian metabolicznych i spadku przeżywalności komórek różnych typów. W przypadku granulocytów obojętnochłonnych są one silnymi bodźcami prowadzącymi do ich aktywacji – pobudzone neutrofile wykazują obniżoną odkształcalność, nasiloną zdolność do przywierania i agregacji, a uwalniane z nich reaktywne formy tlenu i enzymy proteolityczne mogą istotnie zaburzać strukturę i funkcje śródbłonna naczyniowego. Należy w tym miejscu zauważyć, iż wpływ procesów hipoksji-reoksygenacji na funkcje tych komórek badano dotychczas przede wszystkim z wykorzystaniem komórek izolowanych od osób dorosłych. Granulocyty noworodka wykazują w stosunku do nich szereg różnic: charakteryzują się mniejszą zawartością ziarnistości, obniżoną reakcją na czynniki chemotaktyczne, niższą dostępnością receptorów CR3, mniejszym stopniem wydzielania cytokin i chemokin oraz mniejszą produkcją enzymatycznego NO. Wpływ leków na neutrofile noworodka w warunkach hipoksji-reoksygenacji nie był dotychczas przedmiotem licznych badań. Niewiele wiadomo również o potencjalnym oddziaływaniu w tym zakresie lokalnych anestetyków, powszechnie przecież wykorzystywanych w położnictwie w celu uśmierzania bólu porodowego. W związku z tym, podjęta przez Doktorantkę tematyka pracy jest niezwykle istotna dla bezpośredniego zrozumienia roli jaką mogą pełnić neutrofile noworodka w skutkach klinicznych procesów hipoksji-reoksygenacji w okresie okołoporodowym, a także dla



sprawdzenia czy rola ta może ulegać modyfikacji pod wpływem anestetyków lokalnych stosowanych u rodzących kobiet.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska liczy 107 stron i ma klasyczny układ. Składa się z 9 rozdziałów, obejmujących kolejno wstęp, założenia i cele pracy, opis wykorzystanych materiałów i metod, wyniki, dyskusję oraz wnioski, ponadto streszczenie w języku polskim i angielskim oraz piśmiennictwo. W pracy Doktorantka zamieściła również spis rycin i tabel oraz wykaz stosowanych skrótów, a także zgody komisji bioetycznej na wykonanie badań.

Obszerny, 30-stronicowy wstęp został podzielony na 3 podrozdziały. W pierwszym z nich Doktorantka przedstawiła najważniejsze zagadnienia dotyczące zjawiska hipoksji-reoksygenacji, poświęcając sporo miejsca na dokładne wyjaśnienie roli reaktywnych form tlenu i azotu w uszkodzeniu reoksygenacyjnym i reperfuzyjnym. Następnie scharakteryzowała granulocyty obojętnochłonne i opisała funkcjonowanie tych komórek w warunkach hipoksji-reoksygenacji. Kolejny, ostatni podrozdział, Autorka poświęciła na scharakteryzowanie lokalnych anestetyków i krótkie wyjaśnienie mechanizmu ich działania znieczulającego, opisała również efekty działania anestetyków lokalnych na przebieg reakcji zapalnej (w tym funkcjonowanie granulocytów obojętnochłonnych), także w uszkodzeniu niedokrwiennie-reperfuzyjnym. Rozdział ten jest napisany w sposób ciekawy i wyczerpujący, stanowi dobre wprowadzenie do dalszej części rozprawy doktorskiej.

W rozdziale drugim Doktorantka przedstawiła założenia i cele pracy. Sformułowała 3 cele ogólne, z których najistotniejszy jest ostatni, dotyczący zweryfikowania hipotezy o modulującym wpływie anestetyków lokalnych na wewnątrzkomórkową produkcję RFTiN w granulocytach obojętnochłonnych pełnej krwi pępowinowej i dorosłych osobników, w zależności od rodzaju i stężenia anestetyku oraz czasu trwania reoksygenacji. Ponadto Autorka sformułowała także cele szczegółowe, które w sposób precyzyjny określają zakres i sposób wykonania planowanych analiz.

Rozdział "Materiał i metody" został podzielony na kilka podrozdziałów, zawierających informacje dotyczące zgody komisji bioetycznej na wykonanie badań, wykazu zastosowanych odczynników, pobierania krwi do badań, inkubacji krwi z anestetykami, modelu hipoksji-reoksygenacji *in vitro*, stymulacji granulocytów przez PMA, cytometrycznej oceny wewnątrzkomórkowej produkcji RFTiN, oznaczenia równowagi kwasowo-zasadowej oraz analizy statystycznej. Ta część pracy została opracowana bardzo dokładnie, a kilka jej elementów zasługuje na szczególne podkreślenie. Na potrzeby badań Autorka samodzielnie skonstruowała komorę hipoksyzną, wykorzystując metodę Wright'a i Shay'a, ale wprowadzając też liczne własne modyfikacje mające na celu zwiększenie szczelności i poprawę wydajności jej działania.

BBow

Doktorantka prawidłowo dobrała stężenia poszczególnych anestetyków do zaplanowanych badań i dobrze to umotywowwała. Najniższe użyte stężenia odpowiadały tym obserwowanym we krwi pępowinowej noworodków, u których matek podczas porodu wykonano blokady centralne, a z kolei najwyższe mogą występować lokalnie w tkankach objętych znieczuleniem regionalnym u dorosłych. Również czas inkubacji prób w warunkach hipoksji/reoksygenacji został dobrany w sposób przemyślany, odpowiadający reakcji dwufazowego wzrostu adhezji granulocytów do komórek śródbłonna w okresie wczesnej i późnej reoksygenacji. Metody statystyczne zastosowane w pracy zostały w sposób szczegółowy omówione, dobrano je w sposób prawidłowy, w zależności od tego czy rozkład zmiennych odbiegał bądź nie od krzywej Gaussa.

Z obowiązku recenzenta chciałabym zwrócić uwagę na kilka szczegółów metodologicznych, które wymagają wyjaśnienia. Jak wynika ze zgód komisji bioetycznej, doświadczenia na potrzeby recenzowanej rozprawy doktorskiej prowadzone były od drugiej połowy 2011 roku do czerwca 2017 roku. Szkoda, że przez ten relatywnie długi czas trwania prac badawczych udało się zgromadzić i poddać analizie tylko 16 prób krwi pępowinowej i również 16 od dorosłych ochotników. Ochotnicy zrekrutowani do badań zostali opisani jako zdrowi, niepalący mężczyźni w wieku 20-38 lat. Autorka nie podała jednak dokładnie kryteriów włączenia ich do badań, nie wiadomo więc na jakiej podstawie mężczyźni uznawani byli za zdrowych. W związku z tym prosiłabym Doktorantkę o wyjaśnienie tej kwestii w trakcie obrony pracy. Ponadto, metodologia badań byłaby łatwiejsza do prześledzenia dla czytelnika, gdyby Doktorantka zamieściła schemat obrazujący krok po kroku kolejne etapy eksperymentu. Warto rozważyć przygotowanie takiego schematu, w przystępny sposób obrazującego czasy inkubacji, zastosowane stężenia i warunki tlenowe, przy przygotowaniu publikacji do czasopisma naukowego.

Na pochwałę zasługuje zastosowanie przez Doktorantkę modelu eksperymentalnego z zastosowaniem pełnej krwi. Zdecydowana większość badań *in vitro*, skupiających się na funkcji elementów morfotycznych krwi, wykorzystuje izolowane populacje wybranych komórek. Choć podejście to umożliwia szczegółowe prześledzenie mechanizmów zachodzących w wybranym typie komórek, nie pozwala na zrozumienie jak mechanizmy te mogą być modyfikowane przez inne autologiczne komponenty komórkowe i surowicze. W związku z tym, model pełnej krwi może w bardziej dokładny sposób odzwierciedlać rzeczywistą sytuację oddziaływania procesów hipoksji-reoksygenacji na ludzkie neutrofile i ich modyfikacji przez lokalne anestetyki. Zalety modelu pełnej krwi *in vitro* podkreślane były zresztą w literaturze przez innych badaczy, przede wszystkim toksykologów doświadczalnych. Typową cechą zastosowanego modelu jest natomiast duża zmienność wyników względem wartości przeciętnej, co zresztą dobrze uwidacznia również, przedstawiony przez Doktorantkę na rycinach, rozstęp ćwiartkowy. Niekoniecznie jest to wada modelu pełnej krwi, a raczej wskazanie, iż wyniki uzyskane w badaniach na izolowanych

Bobnel

populacjach komórkowych należy traktować z pewną dozą ostrożności – nie odzwierciedlają one bowiem złożoności procesów i interakcji zachodzących w środowisku, w którym fizjologicznie się znajdują. Z drugiej strony, duża zmienność wyników, której można się spodziewać w modelu pełnej krwi, wymusza niejako konieczność przeprowadzenia dużej liczby niezależnych powtórzeń. Z tego powodu, ponownie stwierdzam, iż liczebność uzyskanych do badań próbek krwi mogła być, w prowadzonym przez Doktorantkę badaniu, większa.

Uzyskane wyniki zostały obszernie i dokładnie opisane, dodatkowo zilustrowano je 9 rycinami i 9 tabelami, które bardzo dobrze uzupełniają tekst. Ryciny są starannie opracowane i mają zwartą formę, jednak zastosowanie różnej skali na osi Y (np. rycina 4-1 i 4-3) w poszczególnych ich częściach nieco utrudnia interpretację wyników. W tabeli 4-1 zestawiono dane położnicze i charakterystykę noworodków, od których pobrano krew pępowinową. Z danych tych wynika, że podczas porodów 8 noworodków zakwalifikowanych do badań nie zastosowano żadnej analgezji, a w pozostałych zastosowano metodę wziewną Entonox (3 przypadki), dożylnie podanie paracetamolu (2 przypadki), metodę łączoną (paracetamol/entonox, 2 przypadki) oraz elektrostymulator TENS (1 przypadek). Z przeglądu literaturowego nie wynika, by czynniki te mogły mieć wpływ na funkcje ludzkich neutrofilów, niemniej jednak byłoby wskazane, by informacja taka znalazła się w pracy. W przeprowadzonych badaniach nie wykazano istotnych statystycznie zmian pomiędzy produkcją RFTiN w warunkach normoksji oraz hipoksji-reoksygenacji w niestymulowanych granulocytach (zarówno we krwi pępowinowej jak i dorosłych ochotników), natomiast w granulocytach stymulowanych PMA produkcja była niższa w komórkach poddanych ekspozycji na hipoksję-reoksygenację. Ponadto uzyskane przez Doktorantkę wyniki wskazują, że dłuższy czas inkubacji, zarówno w warunkach normoksji jak i hipoksji-reaktygenacji, powodował w stymulowanych granulocytach niższą produkcję RFT, a wyższą RFN. Badane przez Doktorantkę anestetyki, czyli bupikawaina, lidokaina i ropiwakaina, w warunkach hipoksji-reoksygenacji powodowały w większości przypadków wzrost produkcji RFT w granulocytach krwi pępowinowej i osób dorosłych, zarówno niestymulowanych jak i stymulowanych PMA, choć zmiany te nie były odnotowane przy każdym z analizowanych stężeń poszczególnych anestetyków oraz czasów trwania reoksygenacji. W przypadku RFN zmiany wykazano wyłącznie w granulocytach stymulowanych PMA. Najwyższą wewnątrzkomórkową produkcję zarówno RFT jak i RFN obserwowano w granulocytach inkubowanych z ropiwakainą. Doktorantka nie poddała analizie wpływu anestetyków lokalnych na granulocyty w warunkach normoksji, choć, jak nadmieniam, badania takie (z Jej udziałem) wykonano w ramach wcześniejszych prac badawczych. Wyniki tych badań nie zostały jednakże włączone do rozprawy doktorskiej, choć Autorka w dyskusji bezpośrednio się do nich odnosi.

Popone

Uzyskane wyniki poddane zostały dyskusji, w której Doktorantka szczegółowo omawia wpływ czasu hipoksji-reoksygenacji na granulocyty obojętnochłonne, różnice między granulocytami krwi pępowinowej i osób dorosłych oraz wpływ anestetyków lokalnych na produkcję RFTiN przez te komórki. Bardzo ciekawą obserwacją jest obniżona produkcja RFT w warunkach hipoksji-reoksygenacji – stoi bowiem w opozycji do dominującego poglądu, według którego warunki te sprzyjają aktywacji neutrofili, uwalnianiu przez nie RFT i powstawaniu uszkodzeń śródbłonna naczyniowego. Jak sugeruje Doktorantka, może to wynikać z zastosowanego modelu pełnej krwi nieekwilibrowanej, w którym rzeczywiste tempo narastania bodźca hipoksycznego i późniejszej reoksygenacji mogło być znacznie wolniejsze niż w przypadku modeli wykorzystujących izolowane populacje komórek. Niestety, określenie rzeczywistego stopnia hipoksji w próbach nie zostało przeprowadzone. Jak tłumaczy Autorka, otwarcie komory hipoksycznej wiązałoby się z reekspozycją na warunki normoksji. Należy jednak zauważyć, iż istnieje możliwość pomiaru poziomu tlenu w warunkach *in vitro* - w tym celu wykorzystuje się specjalne sondy tlenowe o niewielkiej średnicy próbника. Warto więc rozważyć ich zastosowanie w kolejnych badaniach, zarówno do określenia poziomu hipoksji jak i reoksygenacji.

Na podstawie analizy uzyskanych wyników Doktorantka sformułowała w sposób prawidłowy i uzasadniony 3 wnioski, które odpowiadają założonym celom rozprawy. Jedynie stwierdzenie, że modulujący wpływ lokalnych anestetyków na produkcję RFTiN w warunkach hipoksji-reoksygenacji w granulocytach krwi pępowinowej nie ma znaczenia klinicznego jest w moim odczuciu nadinterpretacją wyników rozprawy – przedstawiona do oceny praca ma bowiem tylko i wyłącznie charakter eksperymentalny. Poza tym najniższe stężenia zastosowanych anestetyków, które jak pisze Autorka odpowiadają tym obserwowanym we krwi pępowinowej noworodków, u których matek podczas porodu wykonano blokady centralne, wywoływały istotne statystycznie zmiany w produkcji RFT (w przypadku ropiwakainy i lidokainy w komórkach stymulowanych PMA, w przypadku bupikawainy - niestymulowanych) oraz RFN (w przypadku ropiwakainy i lidokainy w komórkach stymulowanych PMA).

Cytowane piśmiennictwo obejmuje 176 pozycji, wyłącznie anglojęzycznych, i jest prawidłowo dobrane. Ponad 100 pozycji to prace z ostatniego dziesięciolecia.

Praca jest przygotowana bardzo starannie pod względem edytorskim, choć nieliczne błędy literowe i interpunkcyjne uszły uwadze Doktorantki.

Reasumując uważam, że Doktorantka wykazała się umiejętnością doboru właściwych metod oraz formułowania celów badawczych, krytycznej analizy i dyskusji wyników oraz prawidłowego wnioskowania. Przeprowadzone badania niewątpliwie wnoszą istotny wkład w



obecny stan wiedzy na temat wpływu lokalnych anestetyków na produkcję reaktywnych form tlenu i azotu przez granulocyty obojętnochłonne w warunkach hipoksji-reoksygenacji, zasługują na kontynuację i opublikowanie wyników na łamach czasopisma naukowego.

Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska Pani mgr inż. Katarzyny Czerniak posiada wysokie walory poznawcze i w pełni odpowiada kryteriom stawianym rozprawom na stopień doktora zgodnie z art.13 ust 1 ustawy z dnia 13 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2003 r. nr 65, poz.595 z późn. zm.). Wnoszę do Wysokiej Rady Wydziału Lekarskiego I Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu o jej przyjęcie oraz dopuszczenie Pani mgr inż. Katarzyny Czerniak do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Kierownik  
Zakładu Medycyny Środowiskowej  
  
dr hab. Barbara Poniedziałek