



WARSZAWSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY
MEDICAL UNIVERSITY OF WARSAW

Zakład Fizjologii i Patofizjologii Człowieka

Recenzja pracy doktorskiej mgr Mirosława Zająca pt.: „Jednoczesny pomiar transportu wielu jonów przez warstwę ludzkich komórek nabłonka oskrzelikowego linii 16HBE14σ – badanie mechanizmu patogenezy mukowiscydozy” z Katedry Fizyki, SGGW.

Promotor: prof. dr hab. Krzysztof Dołowy

Celem pracy autora było skonstruowanie wieloelektrodowego systemu pomiarowego umożliwiającego jednoczesny pomiar przepływu jonów Na^+ , K^+ , H^+ i Cl^- w poprzek ludzkich komórek nabłonka oskrzelowego linii 16HBE14σ. Skonstruowanie takiego systemu pomiarowego umożliwiło zbadanie wpływu blokerów i aktywatorów struktur błonowych odpowiedzialnych za transport jonów w poprzek nabłonka na stężenie jonów po obu stronach monowarstwy nabłonkowej. Struktury odpowiedzialne za transport jonów były zlokalizowane w części apikalnej i podstawno-bocznej komórek linii 16HBE14σ. Badania były prowadzone w kontekście roli komórek nabłonka dróg oddechowych w patogenezie mukowiscydozy. Przyczyną tej patologii jest kanałopatia kanału jonowego chlorkowego typu CFTR. Różne typy kanałopatii tego kanału wskazują, że w mukowiscydozie wydzielanie jonów Cl^- do światła oskrzeli jest wyraźnie zmniejszone. W związku z tym autor modelował kanałopatię kanału CFTR poprzez podanie nieselektywnego lub selektywnego blokera tego kanału. Autor zweryfikował również dotychczasowe hipotezy dotyczące roli komórek nabłonkowych w etiologii i w powstawaniu objawów tej nieuleczalnej i genetycznie uwarunkowanej choroby.

Znaczna część rozprawy doktorskiej dotyczyła metod konstrukcji i weryfikacji działania miniaturowych jonoselektywnych elektrod do pomiaru zmian stężenia jonów Na^+ , K^+ , H^+ i Cl^- i zmian potencjału występujących po obu stronach monowarstwy komórek nabłonkowych. Zmiany stężenia jonów były wywoływane albo przez omywanie odpowiednimi sztucznie skonstruowanymi płynami powierzchni podstawnobocznej i/lub apikalnej nabłonka albo przez podanie blokerów lub aktywatorów struktur błonowych odpowiedzialnych za transport jonów.



WARSZAWSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY
MEDICAL UNIVERSITY OF WARSAW

Zakład Fizjologii i Patofizjologii Człowieka

Autor pracy wnioskuje, że (1) w nabłonku oddechowym jony chloru są transportowane w poprzek monowarstwy nabłonkowej wyłącznie przez białka komórek nabłonkowych, (2) jony sodu są transportowane przez monowarstwę komórek nabłonkowych zarówno przez białka komórek nabłonkowych jak również przez ścisłe złącza komórkowe ale tylko od strony szczytowej do podstawno-bocznej, (3) autor na podstawie swoich badań konkluduje również, że objawy kliniczne mukowiscydozy mogą potencjalnie zależeć od zbyt małego transportu wody przez komórki nabłonka do światła oskrzeli i/lub zmniejszenia wydzielania jonów kwaśno-węglanowych do światła oskrzeli. Brak jonów kwaśno-węglanowych w oskrzelikach uniemożliwia rozprężanie mucyn i prowadzi do zagęszczenia śluzu.

Mam wątpliwości do następujących zagadnień przedstawionych w dysertacji:

Tabela strona 15. Czy rzeczywiście stężenie jonów Cl⁻ w cytoplazmie wynosi 20 mM?

Str. 41 Forskolin nie jest aktywatorem kanału CFTR. Forskolin jest standardowym i powszechnie stosowanym aktywatorem cyklazy adenylanowej. Forskolin może być podawany zewnątrzkomórkowo ponieważ „przechodzi” przez błonę lipidową.

Str. 42 Nie jest wyjaśnione w jakim mechanizmie cAMP aktywuje kanały jonowe typu CFTR. Ponieważ cAMP nie „przechodzi” przez błonę komórkową nie można go podawać zewnątrzkomórkowo. Być może autor miał na myśli sól sodową 8-bromo-cAMP, która jest rozpuszczalnym w lipidach analogiem cAMP i po podaniu zewnątrzkomórkowym dostaje się do cytoplazmy gdzie aktywuje kinazę białkową A.

Ryc. 17 Jaki jest mechanizm raptownego wzrostu oporu transnabłonkowego pomiędzy 5 i 7 dniem hodowli.

Występowały również mniej istotne, ale niekiedy utrudniające zrozumienie tekstu, błędy edytorskie:

Str. 13, l. 6 od góry - za środowisko zewnętrzne uznaje się również powierzchnię przewodu pokarmowego oraz narządów moczopłciowych.

Str. 14, l. 2 – niezręczne zdanie



Str. 14, l.12 oraz l.4 od dołu powtórzone zdanie

Str. 16, nie jestem pewien czy akwaporyny są dobrym przykładem transportu czynnego

Tabela 4, 5, 6, 7, 8, 9 etc. – nieprawidłowy opis podawanych substancji (z podpisu pod Ryciną 29 wynika, że amylorid podawano razem z glibenklamidem etc).

Rozdział 4.1.3 Forskolina nie jest aktywatorem kanału CFTR

Rozdział 4.1.4 cAMP nie „przechodzi” przez błonę komórkową.

Rycina 36. Legenda do Ryciny jest powtórzona dwukrotnie.

Rycina 38 Legenda do Ryciny punkt C, D, E i F nie zgadza się z danymi przedstawionymi na Rycinie.

Str 85 l. 4 od góry - autor chyba miał na myśli jony chlorkowe,

Rycina 41 legenda do Ryciny punkt C, D, E i F nie zgadza się z danymi przedstawionymi na Rycinie 41

Pytania do kandydata:

1. Jakie są poglądy, na sugerowany w dysertacji, mechanizm sprzężenia funkcji kanału sodowego typu ENaC i chlorkowego typu CFTR?
2. Czy komórki nabłonkowe posiadają potencjał błonowy spoczynkowy i jaki jest mechanizm jego powstawania?
3. Nie jest dla mnie oczywiste, że autor zaobserwował transport wody w poprzek monowarstwy nabłonkowej (wynik wskazany we wnioskach). Oczywiście taki transport występował ale w jaki sposób został on zmierzony?
4. Niektóre stwierdzenia autora mogą sugerować, że transport przez ścisłe złącza międzykomórkowe jest regulowany. Czy są dane doświadczalne wskazujące na to, że transport jonów i wody przez te złącza jest regulowany?



WARSZAWSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY
MEDICAL UNIVERSITY OF WARSAW

Zakład Fizjologii i Patofizjologii Człowieka

Do zalet pracy należą:

1. Prace z zakresu biologii medycznej niezwykle rzadko polegają na konstrukcji przyrządów i pomiarowych z następową weryfikacją ich działania oraz wykorzystaniem ich do badań doświadczalnych. Autor podjął się takiego zadania.
2. Tematyka podjęta w dysertacji jest ważna z punktu widzenia praktycznego. Mukowiscydoza jest nieuleczalną kanałopatią uwarunkowaną genetycznie, której przyczyna jest znana ale mechanizm powstawanie jej objawów klinicznych nie jest wyjaśniony. Wyjaśnianie mechanizmu powstawania objawów tej choroby może przyczynić się do zastosowania bardziej skutecznych metod leczenia objawowego tej patologii.
3. Na podkreślenie zasługuje fakt, że zespół w którym kandydat realizuje swoje zadania badawcze, od wielu lat prowadzi badania dotyczące mechanizmów odpowiedzialnych za transport transbłonowy.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska przygotowana przez mgr Mirosława Zajęca pt: „Jednoczesny pomiar transportu wielu jonów przez warstwę ludzkich komórek nabłonka oskrzelikowego linii 16HBE14 σ - badanie mechanizmu patogenezy mukowiscydozy” spełnia warunki określone w artykule 13 ust. 1 z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. nr 65, poz. 595 z późn. zm.). W związku z tym wnioskuję do Rady Naukowej Centrum Medycznego kształcenia podyplomowego o dopuszczenia mgr Mirosława Zajęca do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Profesor dr hab. med. Paweł Szulczyk

Centrum Badań Przedklinicznych i Technologii
ul. Banacha 1B, 02-097 Warszawa
tel./faks: (48) 22 116-61-61
e-mail: zfc@wum.edu.pl, pawel.szulczyk@wum.edu.pl
<http://zfc.wum.edu.pl>