

dr hab. Jan J Kaczor, prof. nadzw.

Zakład Neurobiologii Mięśnia

Katedra Fizjoterapii

Wydział Rehabilitacji i Kinezyjologii

Akademia Wychowania Fizycznego i Sportu w Gdańsku

Dziekanat MWB UG i GUMed
Wpłynęło dnia 18.09.2018
L.dz. nr 29/2018

RECENZJA PRACY DOKTORSKIEJ

mgr Michała Grabowskiego

pt. „Analiza wybranych czynników molekularnych wpływających na poziom homocysteiny w patogenezie niedokrwiennej udaru mózgu”

Rozprawa doktorska mgr Michała Grabowskiego ma charakter eksperymentalny i częściowo jest oparta na wynikach badań, które ukazały się w recenzowanych czasopismach naukowych z listy filadelfijskiej.

Udar mózgu stanowi niezwykle istotny problem kliniczny jak i społeczny. Według raportu WHO z 2014 roku dotyczącego lat 2000-2012, udar mózgu jest częstą przyczyną zgonów osób dorosłych, zaraz po chorobach serca i pierwszą przyczyną niepełnosprawności, w krajach rozwiniętych. Ryzyko występowania udaru mózgu rośnie wraz z wiekiem. Osoby poniżej 50-go roku życia narażone są w 20% zaś u osób powyżej 65-go roku życia ryzyko występowania udaru mózgu szacowane jest na poziomie 75%. Co więcej, prognozy przedstawione w międzynarodowym raporcie "Udary mózgu: skala problemu" pokazują, że w ciągu najbliższych 20 lat można spodziewać się niemal 35-procentowego wzrostu liczby udarów w UE. Polska jest drugim po Rosji krajem w Europie o największym odsetku zgonów spowodowanych udarami mózgu. Odsetek ten jest ponad dwukrotnie wyższy, niż w krajach wysokorozwiniętych takich jak: Francja, Niemcy, Hiszpania, czy Wielka Brytania. Co więcej 70% pacjentów, którym udało się przeżyć, pozostaje niepełnosprawnymi. Wydaje się, że poszukiwanie przyczyn tego schorzenia, a także zgłębianie wiedzy na temat mechanizmu(ów) nie w pełni poznanych, odpowiedzialnych za rozwój udaru mózgu, było jak najbardziej zasadne.

Uważam, że przedstawiona praca doktorska omawiająca to zagadnienie jest niezwykle istotna. Tematyka podjętego badania ma duże znaczenie naukowe, społeczno-ekonomiczne jak i kliniczne.

Przedłożona do oceny rozprawa ma klasyczny układ, składający się z: wstępu, który zawiera uzasadnienie podjętego tematu, celu pracy, materiałów i metod, wyników, podsumowania (wnioski), dyskusji oraz streszczenia w języku polskim, (brak w języku angielskim) i piśmiennictwa. Pozycje piśmiennictwa ułożone są alfabetycznie. Przedłożona praca napisana jest na 88 stronach, zawiera: 29 rycin, 4 tabele oraz 98 pozycji piśmiennictwa (w pięciu z nich Doktorant jest współautorem). Proporcje objętościowe poszczególnych rozdziałów są prawidłowe. Układ pracy również nie budzi większych zastrzeżeń i jest czytelny.

Wstęp jest rozbudowany, wprowadza czytelnika w pierwszy moment w zakłopotanie, ponieważ porusza zagadnienia z pogranicza medycyny klinicznej, biochemii, immunologii, biologii molekularnej, a nawet żywienia i suplementacji. Jakkolwiek zagłębiając się w dalsze rozdziały pracy, pozwala czytelnikowi zrozumieć znaczenie poruszanych zagadnień. Doktorant przedstawia istotę podjęcia badanego tematu poczynając od podania definicji udaru i problemu jaki stanowi on w Polsce. Następnie Doktorant prezentuje podział udarów, klasyfikację udarów niedokrwiennych, przebieg i skutki udarów, metabolizm homocysteiny oraz niepożądane efekty akumulacji homocysteiny. Nawiązuje do badań wykazujących, że hyperhomocysteinemia jest jednym z czynników ryzyka udaru mózgu i postępujących zmian miażdżycowych. Przedstawia rolę białek opiekuńczych, możliwego ich wpływu na wiele procesów metabolicznych, jak również zastosowania jednego z flawonoidów-genisteiny na obniżenie stężenia homocysteny we krwi u pacjentów po udarze mózgu. Na końcu Wstępu omawia dość dokładnie typy inhibicji aktywności enzymów, jak okazuje się później, w nawiązaniu do zastosowanych związków i ich wpływu na regulację aktywności badanych enzymów.

Cel pracy opracowany jest bardzo zwięźle. Zawiera 5 punktów, na które Doktorant zamierza znaleźć odpowiedzi. W skrócie cele pracy to: zbadanie wpływu białek szoku termicznego na aktywność syntazy metioninowej, porównanie aktywności białek w warunkach stresu w obecności białek szoku termicznego. Oszacowanie stężenia przeciwciał anti-Hsp we krwi pacjentów w ostrej fazie udaru mózgu i poszukiwanie korelacji między czynnikami udaru mózgu a anti-Hsp, jak również określenie mechanizmu oddziaływania genisteiny na aktywność enzymów i stężenie homocysteiny, w warunkach *in vitro* oraz *in vivo*.

Uważam, że cele pracy są prawidłowo sformułowane i stanowią uzasadnienie podjęcia badanego tematu.

Materiały i metody są napisane na 13 stronach. Wydaje się, że ten rozdział jest dość dobrze przedstawiony, zawiera on zastosowanie poszczególnych metod takich jak: oczyszczanie białek, pomiar aktywności enzymów, wykonanie oznaczeń immunoenzymatycznych, badanie wpływu genisteiny na aktywność enzymów, czy wyznaczanie typu inhibicji enzymów i innych pomiarów. **Jednakże, uważam, że Doktorant w tym rozdziale powinien wyraźnie zaznaczyć, iż praca doktorska jest częściowo napisana na podstawie publikacji, których jest współautorem, a wyniki badań zostały już opublikowane wcześniej oraz na podstawie metod badawczych wykonanych według innych autorów.** Dla potwierdzenia na stronie 78 Rozdział 9 Publikacje „Wyniki doświadczeń były podstawą niżej wymienionych publikacji” jest wykazanych pięć publikacji z lat 2012-2017, których współautorem jest Doktorant, a które ściśle powiązane są z przedstawioną do recenzji pracą. Muszę stanowczo podkreślić, że nie ma możliwości odróżnienia, które metody z opisanych w tym rozdziale zostały już opublikowane, a które nie, brak jest odnośników piśmiennictwa. Jeżeli część z metod została już wcześniej opublikowana a sądzę, że to miało miejsce (strona 78), to opis zastosowanych metod powinien być krótszy z uwzględnieniem „własnego” piśmiennictwa. **Trudno jest uwierzyć, aby wszystkie dość szczegółowo opisane metody zostały „opracowane” przez Doktoranta i nigdy nie były opublikowane. Jako Recenzent muszę podkreślić, że prac już opublikowanych, czyli po pozytywnych recenzjach, nie będę oceniał po raz wtóry, ponieważ byłaby to ocena recenzentów a nie autora i/lub współautora prac.** Dla przykładu strona 27 „Oczyszczanie białek szoku termicznego” podane jest, że oczyszczano zgodnie z metodami wg. Żylicz i wsp. 1985.

Po pierwsze, proszę o wyjaśnienie dlaczego Doktorant nie zacytował „własnych” publikacji i nie skrócił odpowiednio opisu dla poszczególnych metod. Po drugie sądzę, że zastosowane i zmodyfikowane metody były według innych autorów, co więcej, brak jest odnośników piśmiennictwa w opisie.

Wyniki badań w tej rozprawie są przedstawione w postaci rycin i tabel na 33 stronach. Tabele i ryciny są przejrzyste i wystarczająco omówione w tekście. Co więcej, w tym rozdziale Doktorant pokazuje i cytuje wyniki badań pochodzące z „własnych” opublikowanych prac. Mam wrażenie że opis rycin, które jak dotychczas nie zostały opublikowane, zostały przygotowane niestarannie. Na przykład Ryc. 11 strona 48-49, pomiar aktywności reduktazy metylenotetrahydrofolianowej, Doktorant zbyt dużo uwagi poświęcił na

przedstawieniu reakcji, a dokładniej braku reakcji między 6 a 20 minutą, a zbyt mało uwagi szybkości reakcji między 2 a 6 minutą pomiaru. Stwierdzając przy tym, że „odzwierciedla liniowy spadek absorbancji w czasie (ryc .11)”. Następne zdania i powoływanie się na „(Ryc. 10)” są raczej błędne, proszę o wyjaśnienia.

Podsumowanie przedstawione w kilku punktach jest zgodne z postawionymi celami pracy i jest sformułowane jasno i prawidłowo oraz zawiera odpowiedzi na postawione zadania-problemy badawcze.

Dyskusja jest napisana na 5 stronach i jest wyczerpująca i prowadzona prawidłowo. Doktorant porównuje w tym rozdziale „własne” wyniki badań, które już wcześniej opublikował i te, które jeszcze nie są opublikowane z wynikami innych autorów. Potwierdza, że dochodzi do tworzenia się silnego kompleksu genisteina-homocysteina. Jak sugeruje, tworzenie takiego kompleksu może prowadzić do obniżenia stężenia homocysteiny. Następnie taki kompleks mógłby być usuwany z organizmu lub metabolizowany, co pozwala na wytłumaczenie zaobserwowanego spadku stężenia homocysteiny we krwi pacjentów, w trakcie suplementacji genisteiną. Jakkolwiek, stwierdzenia Doktoranta tego typu „wykonane przeze mnie doświadczenia” lub tego podobne uważam, że są nadmiernie wyeksponowane chociażby dlatego, że nie jest jedynym autorem opublikowanych już wcześniej prac itd.

Uwagi i sugestie

Z obowiązku recenzenta chciałbym przekazać kilka uwag i uściślić następującą kwestię:

Praca napisana jest niestarannie, praktycznie na każdej stronie znajdują się błędy począwszy od „zlanych wyrazów” poprzez interpunkcyjne, stylistyczne do merytorycznych: np. Streszczenie „Akumulacja homocysteiny wywołuje stan stresu oksydacyjnego.....” „„Stosowanie genisteiny zmniejszało poziom homocysteiny we krwi ...” i dwa zdania niżej „hamowanie reduktazy metylenotetrahydrofolianowej i dh mleczanowej przez genisteinę....co powinno prowadzić do akumulacji homocysteiny”. Proszę o interpretację.

Wstęp: strona 9 doniesienia na temat „.....śmiertelności .. zapadalności na udary....” Są nowsze prace np. z 2014 a nie z 1997 roku, Dlaczego Doktorant nie cytuje nowszych informacji na ten temat?

strona 11 „..... beztlenowy prowadząc do gromadzenia się kwasu laktozowego... „ Proszę o interpretację.

strona 12 „..... i gromadzenie się wolnych rodników prowadzące do”

Uprzejmie proszę o przesłanie całej pracy i ustosunkowanie się do tych „zdarzeń”

Piśmiennictwo- braki i błędy np.:

Wstęp strona 13 .. Blackwell, 2010; Chandler i wsp. 2009 brak tych pozycji w spisie Bibliografii

strona 18 „Ekspresja tego białka prowadzi do.....(Kim i wsp. 2011)” delikatnie ujmując cytowana praca jest nieodpowiednia.

strona 21 proszę sprawdzić cytowania i odnośniki piśmiennictwa, ponieważ albo jest ich brak albo jest nieodpowiednie cytowanie. Nie będę więcej wymieniał podobnych sytuacji.

Proszę również w tym przypadku o sprawdzenie pod tym kątem pracy i odniesienie się dlaczego w rozprawie pojawiły się tego rodzaju błędy.

Materiały i metody, jak wcześniej wspomniałem proszę o wskazanie tych metod, które zostały już opublikowane przez Doktoranta jako autora i/lub współautora we wcześniejszych pracach oraz tych, które zostały wykonane na podstawie innego piśmiennictwa. Proszę o wyjaśnienie dlaczego w tym rozdziale w większości opisanych metod nie zastosowano odnośników piśmiennictwa.

Proszę również o przedstawienie w trakcie publicznej obrony „udziału” Doktoranta w przygotowaniu i powstaniu pięciu publikacji, których jest współautorem strona 78. Dlaczego nie ma tego typu informacji wpisanych w rozprawie? W dodatku uważam, że do rozprawy, która wykorzystuje już opublikowane wyniki powinny być załączone oświadczenia współautorów (minimum trzech) określające indywidualny wkład każdego z nich w ich powstanie.

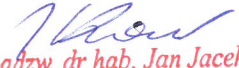
Po wnikliwej lekturze dysertacji Pana mgr Michała Grabowskiego oceniam ją pozytywnie. Warto podkreślić, że jest pierwszym autorem w trzech, raz drugim i raz trzecim w pięciu opublikowanych w latach 2012-2017 publikacjach. Mimo rażąco dużej liczby błędów o mniejszym lub większym znaczeniu, temat którym zajmował się Doktorant jest na czasie i stanowi niezwykle istotny problem kliniczny i socjoekonomiczny. Poszukiwanie mechanizmów zmniejszania ryzyka udarów mózgu oraz każda próba ich wyjaśnienia przyczynia się do poszerzenia wiedzy z nauk podstawowych jak również klinicznych. Czego wymiernym efektem będzie szeroko rozumiana prewencja występowania udarów m.in. poprzez edukację społeczeństwa pod kątem zmiany nieodpowiednich nawyków żywieniowych jak i wprowadzania aktywności fizycznej do swojego życia codziennego.

Uważam, że przedstawiona rozprawa doktorska Pana mgr Michała Grabowskiego pt. "Analiza wybranych czynników molekularnych wpływających na poziom homocysteiny w patogenezie niedokrwionego udaru mózgu" mimo swoich niedoskonałości, braków i błędów, które wyszczególniłem wyżej spełnia wymogi stawiane w myśl Ustawy o stopniach i tytule naukowym rozprawom na stopień naukowy doktora. Dlatego też wnioskuję do Wysokiej Rady Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie Pana mgr Michała Grabowskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego, w tym do publicznej dyskusji nad rozprawą.

Z poważaniem,

Kierownik Katedry Fizjoterapii
AWFiS w Gdańsku

17 IX 2018


prof. nadzw. dr hab. Jan Jacek Kaczor