

Gdańsk, 06.08.2018

Dr hab. Patrycja Koszałka
Katedra Biotechnologii Medycznej
Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii UG-GUMed
Gdański Uniwersytet Medyczny
Tel.: +48 58 3491410
E-mail: pkosz@gumed.edu.pl

Dziekanat MWB UG i GUMed
Wpłynęło dnia 07.08.2018 r.
L.dz. nr 23/2018

Recenzja rozprawy doktorskiej Pana mgr Michała Grabowskiego zatytułowana "Analiza wybranych czynników molekularnych wpływających na poziom homocysteiny w patogenezie niedokrwionego udaru mózgu", wykonanej pod kierunkiem Pana Prof. dr hab. Bogdana Baneckiego

Rozprawa mgr Michała Grabowskiego dotyczy mechanizmów molekularnych leżących u podłoża niedokrwionego udaru mózgu, powiązanych z poziomem aminokwasu siarkowego jakim jest homocysteina. Jej zwiększony poziom, nawet niewiele powyżej normy, jest wskazywany jako czynnik zwiększający ryzyko rozwoju chorób sercowo-naczyniowych, a także chorób neurodegeneracyjnych, wad rozwojowych płodu czy rozwoju nowotworów. Przy czym szacuje się, że podwyższony poziom homocysteiny występuje u co dziesiątego mieszkańca Europy.

Homocysteina (razem z adenozyną) są produktem przemian biochemicznych metioniny, aminokwasu, którego biosynteza nie zachodzi *de novo* u większości eukariontów, ale jego przemiany biochemiczne prowadzą m.in. do powstania nośników grup metylowych, kluczowych dla przebiegu ponad 100 typów różnego rodzaju procesów metylacji. Uwolniona w wyniku tych przemian homocysteina może zostać remetylowana do metioniny poprzez syntazę metioninową albo przekształcona do aminokwasu, cysteiny. Dlatego też, poziom homocysteiny może być ważnym wskaźnikiem procesów związanych z metylacją zachodzących w naszych organizmach. Dlatego też uważam, że cele pracy doktorskiej, Pana mgr Michała Grabowskiego, skupiające się na określeniu procesów regulujących szlaki związane z przemianami prowadzącymi ostatecznie do generowania homocysteiny, są istotne nie tylko naukowo, ale mają także potencjalnie duże znaczenie kliniczne.

Mgr Grabowski w swojej pracy porusza kilka ważnych problemów naukowych. Pierwsza część jego pracy, określająca rolę białek szoku termicznego w regulacji aktywności syntazy metioninowej oparta jest na hipotezie wiążącej stres oksydacyjny wywołany akumulacją homocysteiny ze zwiększoną ekspresją białek szoku termicznego. Wyniki tej części pracy zostały opublikowane w *Acta Biochimica Polonica*, z mgr Grzybowskiem jako pierwszym autorem. Choć pierwsze prace wiążące białka szoku termicznego z poziomem homocysteiny w różnego typu patologiach człowieka, zwłaszcza układu sercowo-naczyniowego pojawiły się już w 1996 roku, to jest to pierwsza praca wykazująca wyraźny związek między funkcją białek szoku termicznego oraz witaminą B12 a funkcją syntazy metioninowej. Badania kliniczne z 2006 roku wskazują, że suplementacja witaminą B12 oraz witaminą B6 i kwasem foliowym jest kluczem do obniżenia stężenia homocysteiny w osoczu, to jednak syntetyczna forma witaminy B12, cyjanokobalamina, może prowadzić do zaburzeń funkcji nerek oraz zwiększyć ryzyko wystąpienia chorób sercowo-naczyniowych. Dlatego badania, takie jak prezentowane w tej pracy leżą u podłoża racjonalnej, opartej na zrozumieniu mechanizmów molekularnych, profilaktyki chorób cywilizacyjnych. Przedstawiona korelacja uzyskanych danych z badaniami klinicznymi, także już opublikowana (w 2014 roku w *Acta Biochimica Polonica*, z mgr Grabowskim jako współautorem), tylko zwiększa wagę tych badań.

Określenie roli białek szoku termicznego w funkcjonalności reduktazy metyloetrahydrofolianowej (MetF), enzymu zmniejszającego produkcję aktywnej formy kwasu foliowego, co prowadzi do zwiększonej produkcji homocysteiny, także jest ważnym problemem naukowym. Polimorficzna forma termowrażliwa tego enzymu występuje u 10% populacji ludzkiej a wcześniejsze publikacje skupiały się głównie nad aspektami klinicznymi oraz analizami populacyjnymi i dopiero kilka ostatnich lat przyniosło odpowiedzi na pytania związane z mechanizmami molekularnymi analizowanych procesów. Przedstawione w rozprawie wyniki, opublikowane w *Metabolic Brain Disease*, w 2016 roku, z mgr Michałem Grabowskim jako pierwszym autorem pracy, wnoszą tutaj swój niewątpliwy wkład.

Dodatkowo, przedstawione analizy wpływu genisteiny, nutraceutyku stosowanego w hormonalnej terapii zastępczej i wskazywanego jako potencjalny lek przeciwnowotworowy, wpisuje się w nurt prewencji chorób opartej na odpowiednim odżywianiu. Zwłaszcza przedstawienie wpływu genisteiny na funkcjonalność reduktazy MetF, w obecności homocysteiny. Wyniki te także zostały już opublikowane.

Dlatego też z chęcią przystąpiłam do dokładnej lektury przedstawionej mi do recenzji rozprawy.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska ma 88 stron obejmujących 29 rycin, cztery tabele oraz 90 odnośników literaturowych uwzględnionych w spisie bibliografii. Praca ma typowy układ i składa się z 11 rozdziałów, spisu treści, spisu skrótów, streszczenia, wstępu, celów pracy, materiałów i metod, wyników, rozdziału podsumowującego wyniki, dyskusji, spisu publikacji wynikających z przedstawionej pracy oraz bibliografii. Niestety, mimo dużej wartości merytorycznej tej pracy musiałam w trakcie jej lektury zmierzyć się z pewnymi rozczarowaniami zarówno ze strony formalnej jak i merytorycznej.

Mgr Grabowski wykonał **spis treści** wykorzystując najprostszą opcję układu graficznego, co jednakże sprawia, że jest on bardzo trudny do przeszukania.

Spis skrótów jest niestety niekompletny i nieco niekonsekwentny. Zawarte są w nim powszechnie znane skróty takie jak ATP, czy ATPaza, natomiast pominięte są trochę mniej powszechne znane rozwinięcia skrótów takich jak NAD, SAM, a zwłaszcza skrót TIA, oznaczający przemijający atak niedokrwienny, który nigdzie nie został rozwinięty.

Streszczenie jest trudnym elementem. W tej rozprawie, mimo, że przedstawia ono krótki wstęp, metodykę oraz uzyskane wyniki doświadczeń, to nie przedstawia ono wspólnej logicznej myśli powiązanej z tytułem pracy a jedynie podsumowania poszczególnych wyników. Powiązanie wyników doświadczeń z poziomem homocysteiny jest mocno uboczne i nie przedstawia żadnych ogólnych końcowych wniosków, jakie można wyciągnąć z tych doświadczeń. Brak jest, zarówno w streszczeniu jak i właściwie w całej pracy klarownego końcowego wniosku, związanego z tytułem pracy, podsumowującego wpływ białek szoku termicznego i genisteiny na poziom homocysteiny w niedokrwieniu związanym z udarem mózgu. Mam nadzieję, że takie podsumowanie zostanie przedstawione w trakcie publicznej prezentacji.

Wstęp liczący prawie 16 stron wskazuje na dobrą i szeroką znajomość zagadnień bezpośrednio związanych z tematyką pracy doktorskiej. Na początku bardzo jasno i przejrzyście wprowadza nas w zagadnienie jakim jest udar mózgu. Jednakże dane dotyczące śmiertelności udaru mózgu w Polsce są danymi sprzed ponad 20 lat. Jest to znaczny okres czasu w medycynie, zwłaszcza, że w latach 90-tych wprowadzono znaczące zmiany w podejściu do profilaktyki udaru mózgu, diagnostyce i leczeniu, co wyraźnie zmieniło te wskaźniki już w 2005 roku. Dlatego też prosiłabym mgr Michała Grabowskiego o przedstawienie jak najnowszych danych na ten temat.

W drugiej części wstęp przedstawia informacje dotyczące procesu powstawania płytki miażdżycowej, metabolizmu homocysteiny, roli białek opiekuńczych w zmianach miażdżycowych, wpływu izoflawonów sojowych, w tym genisteiny na poziom homocysteiny. Jednakże każdy z tych rozdziałów, mimo, że bardzo interesująco napisanych, jest tutaj odrębną zamkniętą strukturą i brak w tej części jasno przedstawionego

logicznego powiązania między poszczególnymi częściami, który wskazywałby na kierunek prowadzonych badań. Zwłaszcza ostatni rozdział, dotyczący inhibicji aktywności enzymów, mimo wielu ciekawych przykładów typów inhibicji, zupełnie nie nawiązuje do enzymów metabolizmu homocysteiny. Mam jednak nadzieję, że w publicznej prezentacji taki ciąg logiczny zostanie przedstawiony, zwłaszcza, że udało się mgr Grabowskiemu przedstawić go w dyskusji. Jednakże głównym niedoborem wstępu jest brak informacji dotyczącej struktury i funkcji analizowanych enzymów w komórkach bakteryjnych, na których oparta była większość pracy. Opisane są jedynie enzymy występujące u ludzi. Jedynie w Materiałach i Metodach pojawiają się dwa zdania, wskazujące, że białko bakteryjne MetH jest homologiem ludzkiej syntazy metioniny, i że stopień homologii jest wysoki, przy czym brak przy tej informacji odnośnika bibliograficznego. Ponieważ większość pracy opierała się na enzymach bakteryjnych, ale praca odnosi się do udaru mózgu, jest to spory brak. Prosiłabym mgr Grabowskiego o wskazanie na ile wysoki jest poziom homologii między analizowanymi enzymami bakteryjnymi a enzymami występującymi u ludzi i czy rzeczywiście uzyskane wyniki są przetłumaczalne z systemu bakteryjnego na człowieka.

Cele pracy zostały sformułowane w rozprawie w sposób jasny i niebudzący żadnych wątpliwości merytorycznych.

Rozdział **Materiały i metody**, obejmujący 13 stron, jest bardzo istotny, pozwala bowiem na powtórzenie metodyki stosowanej w tej rozprawie. Dlatego też ograniczenie się do podania odnośników literaturowych do grupy prac w podrozdziale dotyczącym oczyszczania białek szoku termicznego, jest nieodpowiednie. Chyba, że mgr Grabowski sam nie oczyszczał tych białek, ale w tym przypadku powinno to być albo zaznaczone w metodyce albo ta informacja oraz odpowiedni odnośnik bibliograficzny powinny pojawić się w wynikach. Także w przypadku innych metod powinno to być zaznaczone, bo myślę, że to nie mgr Grabowski pobierał krew od pacjentów, choć może się mylę. Pozostałe metody są opisane nieźle, w większości dokładnie, choć brakuje kilku niezbędnych informacji. Przede wszystkim, chociaż zastosowanie mieszaniny białek szoku termicznego w celu odtworzenia warunków naturalnych w blaszce miążdżycowej jest doskonałym pomysłem, to przy podanych stężeniach zastosowanych w doświadczeniu, brak jest jakiegokolwiek uzasadnienia, co do stosowanych stężeń, nawet w postaci odnośnika bibliograficznego. Chciałabym usłyszeć od mgr Grabowskiego uzasadnienie, co do stosowanych stężeń białek szoku termicznego. Brak jest także informacji dotyczącej numeru zgody Niezależnej Komisji Bioetycznej ds. Badań Naukowych oraz pozyskania zgód pacjentów na pobranie materiału badawczego. Nie wiem także, czemu rozdział nazywa się **Materiały i metody**, gdy w całym rozdziale nie jest zaznaczone pochodzenie ani jednego odczynnika. Ponieważ pochodzenie odczynników jest bardzo ważne w przypadku powtarzalności metody brak tej informacji jest tutaj problematyczny. Brak też odpowiedniej informacji w przypadku używanego materiału biologicznego, jak zmutowanych szczepów bakteryjnych, plazmidów, a także w przypadku stosowanego oprogramowania. W przypadku pracy z genisteiną, podana jest informacja, że była ona rozpuszczona w rozpuszczalniku organicznym, jakim jest DMSO, związek mogący zmieniać konformację biomolekuł, w ten sposób wpływając na ich aktywność biologiczną. Jednakże zamiast końcowego stężenia DMSO w mieszaninie reakcyjnej, podana jest informacja, że "Test wykonano z użyciem 20 μ l DMSO co odpowiada ilości DMSO użytego w teście z 500 μ M genisteiną". Ponieważ nigdzie w tym rozdziale nie podano objętości mieszaniny reakcyjnej, stężenie końcowe DMSO pozostaje tajemnicą. Także w wynikach jest przedstawiony wykres pokazujący aktywność enzymu MetF bez DMSO oraz z jednym stężeniem DMSO, określonym w tekście jedynie jako "najwyższe". Ponieważ także pracuję z genisteiną, chciałabym się dowiedzieć, jakie było używane stężenie DMSO, najlepiej w wartościach procentowych.

Reszta to drobne problemy, jakże popularne w wielu dysertacjach naukowych np. opis inaktywacji i renaturacji syntazy metioninowej do doświadczeń z białkami szoku termicznego podaje tylko, że inaktywacja

wykonywana była w obecności soli, i trzeba samodzielnie cofnąć się do odrębnie opisanej metody denaturacji termicznej tej syntazy, aby się zorientować, że najprawdopodobniej jest to mieszanina chlorku sodu, potasu i magnezu, ponieważ mgr Grabowski nie stosował w tej pracy odnośników między metodami. W obu metodach nie wskazano też stosowanego buforu, choć można założyć, bez 100% pewności, że jest to bufor fosforanowy. Jednakże część ta spełnia swoje podstawowe zadanie, czyli ułatwia zrozumienie podłoża metodycznego uzyskanych wyników.

Wyniki przedstawione na 33 stronach stanowią najciekawszą część rozprawy i najlepiej napisaną. Nic dziwnego, ponieważ większość przedstawionych wyników została już opublikowana. Zostało to wyraźnie zaznaczone w tekście, chociaż mgr Grabowski nie powstrzymał się od literówki podając datę publikacji gdzie jest pierwszym autorem jako 2013 rok, a opublikowana została ona w grudniu 2012 roku. Zresztą z całych wyników, mgr Grabowski cytuje jedynie prace zespołu badawczego, którego był członkiem. Chciałabym tutaj zaznaczyć, że gdy podaje się informację, że jakieś określone stężenie wybrano na podstawie danych literaturowych (jak w przypadku stężeń witaminy B12), to należy taką pozycję zacytować. Brak także odwołań do rozdziału Materiały i metody. Dodatkowo, w przypadku ryciny nr 12 użycie koloru jasnożółtego okazało się błędem, ponieważ po prostu linii tej prawie nie widać. Padło także kilka niefortunnych sformułowań np. "Wysoki poziom korelacji poziomu homocysteiny z tymi czynnikami ryzyka (choroba wieńcowa, hipercholesterolemią i nadciśnieniem) można tłumaczyć danymi doświadczalnymi, w których powiązano rozwój choroby wieńcowej oraz nadciśnienia z poziomem homocysteiny", co właściwie w skrócie oznacza, że korelację między tymi danymi możemy wyjaśnić korelacją między tymi danymi. Jednakże mgr Grabowski dość sprawnie prowadzi nas przez wyniki eksperymentów, wskazując ich logikę oraz dość jasno przedstawiając ich interpretację.

Dla mnie szczególnie ciekawe było przedstawienie mechanizmu działania genisteiny a także przedstawienie uniwersalności jej działania inhibitorowego na aktywność enzymów wykorzystujących NADH. Jest to kolejny aspekt, który powinno się uwzględnić przy ocenie działania genisteiny jako nutraceutyku. Jednakże przy ocenie wpływu genisteiny na wzrost bakterii mam pytanie dotyczące wyboru modelu. Dlaczego właśnie *Bacillus subtilis*, a nie któraś z bakterii służących do komercyjnej produkcji witaminy B12 jak np. *Bacillus megaterium* albo *Pseudomonas denitrificans* lub bakterii ludzkiej flory bakteryjnej, na którą mogłaby wpływać genisteina przyjmowana przez ludzi? Miałoby to lepsze przełożenie na zastosowanie genisteiny. Wprawdzie w pracy jest wskazane, że mgr Grabowski kierował się znaczną wrażliwością tej bakterii na genisteinę, ale czy oznacza to, że bakterie służące do fermentacyjnej produkcji witaminy B12 w tym bakteria z tej samej rodziny czy też żadna z rozlicznych bakterii flory bakteryjnej człowieka nie są wrażliwe na genisteinę i dlatego konieczny był wybór *laseczki siennej*?

Wyniki kończą się podsumowaniem, które jest jasnym i klarownym skrótownym wypunktowaniem wyników. Jednakże ponownie, jak w przypadku streszczenia, mamy wyniki przedstawione jako odrębne grupy doświadczeń, każda z nich realizującą określony cel badawczy, tak jakby każdy z tych celów był zupełnie niezależnym projektem badawczym. Brak też ogólnego podsumowania, które wiązałoby się bezpośrednio z tytułem pracy. Myślę, że widzimy tutaj problem, który pojawia się, gdy wyniki zostaną opublikowane przed przygotowaniem rozprawy doktorskiej. Pojawia się wtedy tendencja do użycia opublikowanych prac, jako wzorców do jej napisania. Jednakże trudno w tym momencie wyjść poza schematy stworzone przez publikacje i przedstawić całościowo ciąg badawczy przedstawiony w dysertacji. Ponownie mam nadzieję, że mgr Grabowski będzie w stanie to zrobić w prezentacji ustnej.

Choć trzeba przyznać, że **Dyskusja**, mimo, że krótka, tylko 5-stronicowa, taki ciąg logiczny dobrze przedstawia. Jest zgodna z tytułem pracy, napisana bardzo ciekawie i logicznie, choć autor uprościł sobie trochę pracę, i w częściach, gdzie dyskutował wyniki opublikowane w publikacjach gdzie był pierwszym

autorem, podpierał się dość mocno tłumaczeniem tekstu dyskusji z tych publikacji. Nie stanowi to jednak problemu. Problemem jest natomiast to, że z 23 publikacji użytych do dyskusji, jedynie 3 z nich pochodziły z ostatnich 5 lat, jedna z 2015 a dwie z 2014 roku. Rozumiem, że tematy poruszane w rozprawie nie są jeszcze dokładnie przebadane i może być mało dostępnych publikacji naukowych ściśle związanych z tematem pracy. Dlatego ta praca wprowadza znaczący wkład w rozwój nauki. Mgr Grabowski zacytował większość dostępnych publikacji ściśle związanych z tematem badawczym pracy wykazując się dobrą znajomością danych literaturowych oraz umiejętnie przedstawił znaczenie uzyskanych poszczególnych wyników w szerszym kontekście. Jednakże myślę, że choć kilka nowszych publikacji dałoby się znaleźć, choćby publikację zespołu prof. Baneckiego z 2017 roku, która jest kontynuacją wyników związanych z oddziaływaniami między homocysteiną a genisteiną, gdzie między innymi rozszerzono model badawczy z *Bacillus subtilis* do także *Vibrio harveyi*. Uzyskane zbliżone wyniki na tym modelu, byłyby ciekawym podparciem wyników przedstawionych w tej pracy. Nowsze publikacje byłyby też lepszą podporą do przedstawianych podstaw literaturowych przeprowadzanych doświadczeń. Trochę zabawne jest, gdy autor pisze: „Obecnie przyjmuje się, że mechanizmem prowadzącym do znacznego podniesienia poziomu odpowiedzi immunologicznej...” cytując jednocześnie jedynie publikację sprzed 11 lat, co w immunologii jest olbrzymim okresem czasu. Ponownie wspomnę, że tak samo jak w streszczeniu, tutaj także brak jest kończącego pracę paragrafu podsumowującego znaczenie uzyskanych wyników.

W **Spisie bibliografii** na 90 pozycji literaturowych, do których odnosi się ta praca, tylko 20 jest z ostatnich 10 lat w tym zero z ostatnich 5 lat. Rażąco rozbieżność z przedstawionymi przeze mnie danymi dotyczącymi odnośników literaturowych w dyskusji może pogodzić dostrzeżony przez mnie fakt, że z 23 pozycji cytowanych w dyskusji zaledwie jedna z nich jest umieszczona w spisie bibliograficznym, co trzeba przyznać było dość irytującym faktem.

Problemy z prawidłowym spisem bibliograficznym, nie kończą się jedynie na tym, że brak jest sporej części prac cytowanych w tekście, ale także spis ten ma nieprawidłowy układ np. czasami skróty czasopism zawierają kropki a czasami nie, do kilku prac dołączone są doi a do reszty nie. Publikacja Evans et al., 2004 nie ma podanej informacji o czasopiśmie poza pierwszymi literami "Proc". W publikacji Drennan et al., 1994 jest nieprawidłowy zapis angstromów (ogólnie, w spisie literatury zapis znaków spoza standardowego zakresu czcionek jest w większości nieprawidłowy, wskazując na to, że albo użyto nieprawidłowej czcionki do wprowadzenia ich do tekstu, albo autor zmienił czcionkę i nie sprawdził jak to wpłynęło na zapis). Dodatkowo, tak jak już wspomniałam wcześniej, przy niektórych ważnych informacjach odnośniki bibliograficzne po prostu nie zostały podane np. przy opisach postępowania w leczeniu skutków udaru czy etiologii miażdżycy, przy klasyfikacji udarów OSCP (choć do klasyfikacji TOAST są podane) itp.

Dodatkowo praca charakteryzuje się niezwykle licznymi literówkami, zarówno w streszczeniu (np. "tz" zamiast "tzw.", "termowraliwości", "krwii"), wstępie (np. "kliku"), materiałach i metodach (np. "złóżą" zamiast "złoża", "wyznazenie". "reduktacy", "eksperymentalenj") oraz w pozostałej części pracy. Widoczne jest też bardzo kreatywne stosowanie kropek. Kropki są czasami przed a czasami po cytowaniu, a jeszcze czasami tu i tam albo nigdzie, a czasami zastąpione przecinkiem. Nawet trafiłam na układ kropka, przecinek, kropka, no bo czemuż się ograniczać do pojedynczego znaku przestankowego. Niestety ścisłe zasady interpunkcji w języku polskim powinny znacznie ograniczyć prezentowaną tutaj swobodę. Pojedynczo są to jedynie drobne problemy, ale razem składają się na obraz pewnego niechlujstwa językowego. Mimo tego od strony stylistycznej praca jest napisana zrozumiałym językiem polskim, poprawnym pod względem naukowym, pozbawionym w większości żargonu czy skrótów myślowych.

Jednakże, jak wspomniałam na początku, wyniki uzyskane w trakcie realizacji ocenianego doktoratu i zamieszczone w recenzowanej rozprawie zostały opublikowane w postaci 5 prac doświadczalnych w

czasopismach z lity filadelfijskiej: dwa razy w Acta Biochimica Polonica, w Biochemical and Biophysical Research Communications oraz dwa razy w Metabolic Brain Disease. Trzy prace, w których mgr Grabowski był pierwszym autorem, mają łączny IF ok. 5,9, natomiast dwie pozostałe mają łączny IF ok. 3,6. Przytoczone wartości wskazują na dobry poziom naukowy publikacji będących podstawą pracy doktorskiej. Jednakże brak oświadczeń autora lub współautorów wskazujących na procentowy udział mgr Grzybowskiego w powstaniu tych prac, utrudnia ocenę wkładu doktoranta w powstanie tych prac.

Podsumowując, mogę stwierdzić, że przedstawiona rozprawa, mimo pewnych niedociągnięć, pokazuje, że Doktorant potrafi sformułować rzetelne hipotezy badawcze i zweryfikować je odpowiednimi metodami, co wskazuje na jego zdolność do samodzielnego podjęcia pracy badawczej w przyszłości. W związku z czym, stwierdzam, że **przedstawiona rozprawa spełnia wymagania Ustawy z dnia 14 marca 2003 o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2003 Nr 65 poz. 595 z późniejszymi zmianami - tekst jednolity Dz. U. 2017, poz. 1789)**. Dlatego też wnoszę do Rady Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii UG-GUMed o dopuszczenie mgr Michała Grabowskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

P. Koszałka