



UNIwersytet Medyczny
w Lublinie

dr hab. Joanna Listos,
profesor uczelni

.....

Katedra i Zakład Farmakologii z
Farmakodynamiką
Wydziału Farmaceutycznego
Uniwersytetu Medycznego w Lublinie
ul. Chodźki 4a, 20-093 Lublin
tel. 81 448 72 53
e-mail: a.listos@umlub.pl

O C E N A

pracy doktorskiej mgr. Konrada Grzeszczaka

pt. **„Ocena stężenia wybranych pierwiastków i parametrów stresu oksydacyjnego
w popłodach pochodzących z ciąż mnogich”**

Okres ciąży jest niezwykle istotny dla prawidłowego funkcjonowania nowego organizmu. Niewłaściwy poziom makro- i mikroelementów w tym okresie oraz ekspozycja na czynniki stresowe przyczynia się do powikłań w przebiegu ciąży oraz powstawania wad rozwojowych u płodu. Przyczynia się także do obumarcia płodu oraz zwiększenia śmiertelności w okresie pourodzeniowym. Wiadomo, że ciążę mnogą są ciążami zwiększonego ryzyka. Dlatego poznanie istniejących zależności w tym okresie, takich jak poziom makro- i mikroelementów oraz poziom parametrów stresu oksydacyjnego w ciążowych tkankach mogą mieć istotne znaczenie w diagnostyce i profilaktyce stanów patologicznych ciąż mnogich. Należy zauważyć, że badania w tym obszarze są bardzo ubogie. Zatem podjęcie badań zaprezentowanych w niniejszej dysertacji, mających na celu poszerzenie wiedzy w tym zakresie, jest interesujące i uzasadnione.

Przedłożona do recenzji praca doktorska jest pracą oryginalną. Zawiera 168 strony oprawionego, jednostronnego wydruku komputerowego formatu A4. Na początku niniejszej dysertacji umieszczono *Spis treści*, *Wykaz skrótów* oraz *Streszczenia* w języku polskim i angielskim. Następne rozdziały to *Wprowadzenie* oraz rozdział przedstawiający *Hipotezy, cele pracy oraz cele szczegółowe*. Zasadniczą część dysertacji podzielono na 3 części. Pierwszą część stanowi opis opublikowanego artykułu przeglądowego, w którym dokonano przeglądu aktualnych danych literaturowych; drugą część dysertacji stanowi opis metodyki oraz wyniki badań nieopublikowanych; trzecią część stanowi opis artykułu oryginalnego, w którym opublikowano wyniki badań przeprowadzone przez Doktoranta. Kolejne rozdziały to *Podsumowanie i Wnioski* oraz *Ograniczenia badania*, a następnie *Piśmiennictwo*. Pracę zamyka *Wykaz tabel* i *Wykaz rycin*. Dodatkowo załączono wydruk 2 opublikowanych prac (załącznik 1 i 2), Oświadczenia współautorów oraz 4 załączniki (Zgoda na przetwarzanie danych, Informacja dla pacjentek, Uchwały Komisji Bioetycznej). Praca jest przygotowana starannie, nie mam zastrzeżeń do kompozycji pracy.

W rozdziale „*Wprowadzenie*”, który obejmuje 3 strony, w oparciu o aktualne doniesienia naukowe, Autor wprowadza Czytelnika w problematykę badań – przedstawił dane statystyczne dotyczące ciąż mnogich, wskazał na ważną rolę makro- i mikroelementów oraz stresu oksydacyjnego w prawidłowym funkcjonowaniu organizmu. W kolejnym rozdziale Doktorant sformułował w formie 5 punktów hipotezy badawcze oraz wskazał cel badań oraz cele szczegółowe.



W następnym rozdziale Autor omówił Artykuł 1, który stanowi opublikowaną część niniejszej dysertacji. Jest to praca przeglądowa, opublikowana w 2020 roku w czasopiśmie *Biomolecules* (IF = 4,879; MEiN = 100) zatytułowana (w tłumaczeniu na język polski) „Rola pierwiastków Fe, Zn i Cu w okresie ciąży”. Doktorant jest pierwszym spośród trzech współautorów. W publikacji Autor szczegółowo opisał znaczenie trzech pierwiastków i zależności między nimi, ze szczególnym uwzględnieniem ich roli u kobiet w ciąży. Autor przedstawił w formie tabeli publikacje przedstawiające stężenia żelaza, miedzi i cynku w materiale biologicznym pobranym podczas porodu, w różnych krajach. Publikacja została przygotowana w oparciu o liczne, aktualne piśmiennictwo (379 pozycji). Publikacja ta świadczy o doskonałym teoretycznym przygotowaniu Doktoranta do podjęcia badań w tym obszarze.

Kolejny rozdział pracy to *Omówienie nieopublikowanych wyników badań*. W podrozdziale *Wstęp* Doktorant opisał stres oksydacyjny oraz reaktywne formy tlenu i azotu jako czynniki biorące udział w patomechanizmie i progresji wielu chorób. Autor wymienił reaktywne formy azotu oraz tlenu. Podał, że reaktywne formy tlenu mogą być generowane endogennie oraz egzogennie. W tym miejscu, na stronie 23 pojawił się błąd - Autor błędnie zaliczył alkohol, dym tytoniowy, dietę i inne do czynników endogennych. W przedostatnim akapicie *Wstępu* Autor opisał ważną rolę reaktywnych form tlenu jako czynników biorących udział w regulacji procesów takich jak: skurcz mięśni, wydzielanie hormonów, funkcjonowanie układu odpornościowego, różnicowanie komórek, procesy apoptotyczne, tworzenie łożyska czy stymulacja genów prozapalnych. W kolejnym podrozdziale pt. „*Stres oksydacyjny*” Doktorant wskazał, że nadmierny udział stresu oksydacyjnego może zaburzać równowagę pomiędzy produkcją reaktywnych form tlenu a zdolnością organizmu do ich detoksykacji, co może przyczyniać się do rozwoju stanu patologicznego, np. przewlekłego stanu zapalnego. Nadmierna ilość reaktywnych form tlenu może powodować uszkodzenia DNA, białek, zmniejszenie integralności błon komórkowych i może być przyczyną schorzeń neurodegeneracyjnych, sercowo-krążeniowych, zapalnych czy nowotworowych. Nadmierna ilość reaktywnych form tlenu może mieć również wpływ na strukturę i żywotność gamet oraz może przyczyniać się do zaburzeń płodności. Doktorant szczegółowo opisał znaczenie reaktywnych form tlenu dla poszczególnych etapów ciąży oraz przytoczył dane literaturowe dotyczące wpływu parametrów stresu oksydacyjnego na przebieg ciąży. W kolejnych podrozdziałach został opisany system antyoksydacyjny jako naturalny mechanizm obronny przywracający równowagę organizmu w stanach nadmiernego stresu oraz znaczenie pierwiastków śladowych, takich jak miedź, żelazo i cynk, które są kofaktorami enzymów antyoksydacyjnych. Tym samym Doktorant wprowadził czytelnika w tematykę badań, których celem była ocena parametrów stresu oksydacyjnego poprzez określenie stężenia produktów peroksydacji lipidów w błonach płodowych, pępowinie i łożysku pobranych od kobiet w ciąży mnogiej. Ponadto oznaczano poziom enzymów antyoksydacyjnych – dysmutazy ponadtlenkowej, katalazy, peroksydazy glutationowej i reduktazy glutationowej. Oznaczano także stężenie pierwiastków śladowych (miedź, żelazo i cynk). Moim zdaniem cel badań jest ambitny i uzasadniony. Rzeczywiście istnieje potrzeba zbadania roli parametrów stresu oksydacyjnego w przebiegu ciąży, ponieważ wiedza ta może przyczynić się do opracowania metod mających na celu zapobieganie negatywnym skutkom stresu oksydacyjnego w przebiegu ciąży. Nie mam zastrzeżeń do tej części dysertacji.

Następny podrozdział nieopublikowanych wyników badań to *Materiał i metody*. Badania zostały przeprowadzone za zgodą Komisji Bioetycznej Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w



Szczecinie. Do badania włączono kobiety w ciąży mnogiej i noworodki. Charakterystyka badanych kobiet (wiek, masa ciała i jej przyrost w okresie ciąży, czas trwania ciąży, masa łożyska) oraz charakterystyka noworodków (masa urodzeniowa, długość ciała, obwód głowy, szerokość ramion) zostały zestawione w tabeli 1.

Mam zastrzeżenia co do sformułowań - w tabeli Autor użył nieprawidłowych określeń: zamiast masa ciała jest „waga ciała”, ponadto „waga łożyska”, „przyrost wagi w czasie ciąży”. Podobnie, sformułowanie „waga urodzeniowa” zostało użyte w Dyskusji (strona 72)

W eksperymentach Doktorant wykorzystał współcześnie stosowane metody badawcze. Stężenie pierwiastków (miedź, żelazo i cynk) oznaczał metodą optycznej spektrometrii emisyjnej ze wzbudzeniem w plazmie sprzężonej indukcyjnie po uprzednim przygotowaniu próbki do badań (mineralizacja). Parametry stresu oksydacyjnego w tkankach badano po ich homogenizacji za pomocą metody spektrofotometrycznej, która jest powszechnie wykorzystywana w tego typu eksperymentach. Metody te zostały opisane prawidłowo, ale podpisy tabel: 8,9,10,12,14 są niestylistycznie sformułowane. Analizę statystyczną wyników przeprowadzono przy użyciu standardowego oprogramowania. Zbadano normalność rozkładu danych za pomocą testu Shapiro-Wilka. Ze względu na nienormalny rozkład danych zastosowano testy nieparametryczne. Analiza statystyczna wyników została przeprowadzona właściwie.

Uzyskane wyniki badań są interesujące. Zostały one zebrane w formie 10 rycin i 3 tabel. Ryciny i tabele są starannie przygotowane. Wykazano różnice pomiędzy stężeniami miedzi, cynku i żelaza w badanych popłodach. Udowodniono korelację pomiędzy poziomem żelaza w łożysku a długością ciała noworodka; zależność pomiędzy paleniem papierosów przed okresem ciąży oraz wieku ciążowego a poziomem cynku w łożysku. Wykazano wpływ poziomu badanych pierwiastków w popłodach ciąż mnogich na poziom enzymów prooksydacyjno-antyoksydacyjnych oraz na parametry antropometryczne noworodków. Ponadto udokumentowano, że poziom peroksydazy glutationowej u kobiet suplementujących preparaty zawierające jony żelaza w okresie ciąży był wyższy aniżeli u kobiet niestosujących suplementacji; poziom aktywności katalazy był również wyższy u noworodków z prawidłową masą pourodzeniową w porównaniu do noworodków o niskiej masie pourodzeniowej; poziom dysmutazy ponadtlenkowej był obniżony u kobiet palących przed okresem ciąży.

Mam uwagi do tej części pracy.

1. W opisie wyników podano odniesienia do rycin ale są one nieprawidłowe (strona 57);
2. Podpis ryciny 10 dotyczy miedzi a podano, że cynku (strona 62);
3. Na stronie 58 podano odniesienia błędne do tabeli 16 zamiast 17;
4. Moim zdaniem w podpisach rycin użyto nieprawidłowe sformułowania: „Zastosowanie testu Kruskala-Wallisa do porównania stężenia żelaza...”. Powinno być: „Porównanie stężenia żelaza w ... za pomocą testu Kruskala-Wallisa” – dotyczy to wszystkich rycin.

Kolejny podrozdział tej części dysertacji, w której Doktorant prezentuje wyniki nieopublikowane to *Dyskusja*. Została podzielona na mniejsze części, w których Autor umiejętnie omówił uzyskane wyniki w kontekście badań innych naukowców. Przegląd badań naukowych, których dokonał Autor w tym rozdziale, jest imponujący. Podział Dyskusji na mniejsze części uważam za słuszny ponieważ poprawia przejrzystość tak obszernych wyników. Nie mam zastrzeżeń do tej części pracy.



Dodam, że wyniki zawarte w tej części pracy doktorskiej zostały już opublikowane w prestiżowym czasopiśmie: *Grzeszczak i wsp. Biomolecules*, 2023, 13, 797, (IF = 4,879; MEiN = 100), co znacząco zwiększa wartość badań.

Następny rozdział niniejszej dysertacji to *Omówienie artykułu nr 2*, w którym Autor opublikował kolejne wyniki. Jest to praca oryginalna, opublikowana w 2023 roku w czasopiśmie *Life* (IF = 3,251; MEiN = 70) zatytułowana (w tłumaczeniu na język polski) „Stężenie wapnia, potasu, sodu i magnezu w łożysku, pępowinie i błonach płodowych pochodzących z ciąż mnogich”. Doktorant jest pierwszym spośród współautorów. W omówieniu Doktorant opisał fizjologiczne znaczenie makroelementów, a następnie streścił opis i wyniki badania. Poziom poszczególnych pierwiastków był oznaczany metodą optycznej spektrometrii emisyjnej. Wykazano, że poziom badanych pierwiastków różni się w badanych tkankach i może mieć to wpływ na masę łożyska, długość trwania ciąży, obwód głowy noworodka, masę ciała noworodka oraz inne parametry.

W kolejnym rozdziale niniejszej pracy, zatytułowanym *Podsumowanie i wnioski*, Doktorant wskazał wnioski pochodzące z wszystkich przeprowadzonych badań. Zostały one sformułowane w postaci 11 punktów. Według mnie są one bardzo uogólnione, zbyt odległe od przeprowadzonych badań (szczególnie punkty 2,4,5).

W rozdziale *Ograniczenia badania* Autor przedstawił czynniki, które w badaniach nie były brane pod uwagę a mogły mieć wpływ na uzyskane wyniki. Świadczy to o umiejętności krytycznej analizy uzyskanych wyników oraz o przygotowaniu Doktoranta do pracy badawczej.

Rozprawę zamyka obszerny wykaz cytowanego piśmiennictwa w liczbie 188 pozycji. W znacznej większości są to prace opublikowane w ciągu ostatnich 20 lat. Znajomość rozległego piśmiennictwa i umiejętność jego wykorzystania do oceny wyników własnych badań stanowią istotną wartość w pracy naukowej.

W wykazie tabel, podobnie jak w rozdziale *Materiał i metody*, w podpisach tabel są niestylistyczne sformułowania.

Dysertacja, mimo nielicznych sformułowań niestylistycznych, jest bardzo dobrze zaprojektowana i przygotowana. Z obowiązku recenzenta muszę wspomnieć o kilku błędach edytorskich. Błędy te są bardzo nieliczne, nie mają znaczenia merytorycznego i nie wpływają na jakość dysertacji.

Podsumowując, przedstawiona do oceny rozprawa doktorska mgr. Konrada Grzeszczaka, zatytułowana: „Ocena stężenia wybranych pierwiastków i parametrów stresu oksydacyjnego w płodach pochodzących z ciąż mnogich” została prawidłowo zaplanowana i zrealizowana pod względem metodycznym. Uzyskane wyniki są nowatorskie i stanowią poszerzenie dotychczasowej wiedzy na temat stężenia i znaczenia poszczególnych pierwiastków oraz parametrów stresu oksydacyjnego w okresie ciąży. Ponadto, wskazują nowy kierunek badań oraz możliwości badań diagnostycznych w okresie prenatalnym. Uzyskane wyniki badań Doktorant przedyskutował wnikliwie i wyczerpująco. Wskazane przeze mnie uwagi, nie mają wpływu na całość pracy, ale, mam nadzieję, wskazówki te będą pomocne w dalszej pracy badawczej. Zaprezentowaną pracę doktorską oceniam pozytywnie. Moim zdaniem spełnia ona wszystkie wymagania stawiane pracom doktorskim w dziedzinie: nauki medyczne i nauki o zdrowiu, w dyscyplinie: nauki medyczne.

Z pełnym przekonaniem uważam, że przedłożona rozprawa spełnia wymogi stawiane pracom doktorskim w myśl ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule



naukowym, oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. z 2017 r., poz. 1789 ze zm.) i Rozporządzenia Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 20 września 2018 r. w sprawie szczegółowego trybu i warunków przeprowadzania czynności w przewodzie doktorskim, w postępowaniu habilitacyjnym oraz w postępowaniu o nadanie tytułu profesora (Dz.U. z 2018 r., poz.261). Zwracam się zatem do Wysokiej Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Medyczne PUM o dopuszczenie mgr. Konrada Grzeszczaka do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Biorąc pod uwagę fakt, że wszystkie wyniki badań rozprawy doktorskiej zostały już opublikowane w 3 czasopismach o zasięgu międzynarodowym zwracam się z wnioskiem o wyróżnienie pracy doktorskiej.

Joanna Listos

Lublin, dn. 26.05.2023 r.