

Dr hab. Grzegorz Formicki,
Zakład Fizjologii Zwierząt i Toksykologii,
Instytut Biologii
Uniwersytet Pedagogiczny
im. Komisji Edukacji Narodowej w Krakowie

Kraków 27.08.2018

Recenzja

pracy doktorskiej pt. „Zmienność wybranych wskaźników fizjologicznych osocza krwi na modelu mysim zjawiska analgezji, generowana alkoholem etylowym” napisanej przez lek. dent. Krzysztofa Wróbla.

Praca ma układ klasyczny. Rozpoczyna się wykazem użytych skrótów, który poprzedza właściwą część pracy podzieloną na rozdziały: wstęp, cel i założenia pracy, materiał i metody, zestawienie i omówienie wyników, dyskusja, uwagi ogólne, wnioski, literatura, streszczenie w językach polskim i angielskim, wykaz tabel, wykaz wykresów. Całość pracy mieści się na 186 stronach, zawiera 23 wykresy i 31 tabel.

Wstęp jest bardzo obszerny, gdyż zajmuje aż 54 strony. Autor zaprezentował w nim obecny stan wiedzy na temat bólu, oddziaływania etanolu na regulacje fizjologiczne oraz wybrane metabolity, enzymy i elektrolity osocza krwi. Tekst czyta się bardzo dobrze, gdyż został napisany bardzo ładnym, literackim językiem. Niestety styl pisania stosowany przez Autora, w niektórych miejscach, jest mało precyzyjny pod względem naukowym. Autor pisze na przykład o właściwościach fizjologicznych alkoholu, zamiast konkretnie o użytym w badaniach alkoholu etylowym. W innym miejscu możemy przeczytać o tym, że „albuminy osocza przeciwstawiają się przechodzeniu wody z tkanek do osocza...” zamiast np., że obecność albumin powoduje, że woda nie przechodzi z tkanek do osocza. Można także znaleźć stwierdzenie, że „ewolucja wybrała glukozę jako najważniejsze i główne ogniwo łańcucha energetycznego”, albo że glukoza „jest darem słońca ...” Kolejny zarzut, o którym chciałbym wspomnieć to dość częste popadanie Autora w dygresje, które nie wnoszą nic istotnego, a tylko niepotrzebnie wydłużają tekst pracy. Autor pisze np., że informacje na temat produkcji wina można znaleźć w Piśmie Świętym, albo że opisy leczenia bólu znajdują się na babilońskich tabliczkach i egipskim papirusie. Pod względem merytorycznym wstęp zawiera bardzo dobre fragmenty oraz fragmenty słabsze. Autor opisuje metabolizm etanolu i skutki jego działania w organizmie, podaje

definicję bólu i nonycepji. Wyjaśnia, że ból często ma charakter subiektywnego odczucia. Prawidłowo opisuje neurofizjologię powstawania bólu, przewodzenia i modulacji impulsów związanych z bólem. Autor poświęca również miejsce na opisanie kilku teorii tzw. bramkowania bólu. Opisuje wczesne i obecne teorie powstawania bólu, substancje chemiczne biorące udział w powstawaniu bólu, potęgujące wrażenie bólowe oraz wywołujące reakcje fizjologiczne towarzyszące bólowi, jak rozszerzenie naczyń krwionośnych, zwiększony przepływ krwi, obrzęk, stan zapalny. Opisuje analgetyczne działanie morfiny oraz endogennych opioidów. Wyjaśnia zależność między syntezą beta-endorfin, stresem i reakcją bólową. Tekst, który Autor napisał na temat metabolicznych przemian etanolu oraz fizjologii bólu jest bardzo dobry i świadczy o dużej wiedzy. Chciałbym jednak zwrócić uwagę, iż w niektórych fragmentach pracy literatura naukowa jest cytowana w sposób mało przemyślany. Niekiedy, duże fragmenty tekstu, z istotnymi informacjami, nie zawierają odniesień do literatury naukowej, a w innych miejscach cytacji jest zbyt dużo. Jako przykład podam pierwsze 3 zdania wstępu, w których Autor zacytował aż 16 prac naukowych, natomiast nieco dalej, w miejscu gdzie opisywany jest metabolizm etanolu, brakuje odniesień do literatury w tak ważnych kwestiach, jak przebieg reakcji katalizowanej przez dehydrogenazę alkoholową, udział dehydrogenazy aldehydowej i enzymów mikrosomalnych w metabolizmie etanolu.

Inna krytyczna uwaga dotyczy niektórych pojęć używanych w pracy. Autor naprzemiennie używa pojęć wrażliwość, próg pobudliwości a czasem próg wrażliwości. To utrudnia zrozumienie tekstu na temat działania bodźców wywołujących ból. Zresztą Autor sam wpadł w pułapkę nieprecyzyjnych sformułowań, pisząc że przy podwyższonych progach pobudliwości ból mogą wywołać słabe bodźce. Takie stwierdzenie znajduje się na stronie 23. Moim zdaniem Autor powinien posługiwać się pojęciem wartości progowej bodźca, albo potencjału czynnościowego, bo przecież ból związany jest z wytwarzaniem potencjału czynnościowego w receptorach oraz w neuronach dróg aferentnych. Dalsze części wstępu, dotyczące selekcji zwierząt hodowlanych, metabolitom, enzymom i elektrolitom osocza krwi również są poprawnie napisane pod względem merytorycznym. Po przeczytaniu tej części wstępu powstaje jednak wrażenie, że Autor nieco odchodzi od meritum pracy. W podrozdziale „selekcja” brakuje bowiem informacji o prowadzeniu selekcji w hodowlach zwierząt laboratoryjnych, w szczególności pod kątem analgezji. Natomiast opis składników osocza krwi ma raczej charakter podręcznikowy, gdyż Autor w wielu miejscach tekstu, unikał nawiązania do możliwych i prawdopodobnie przez siebie zakładanych zależności, między analgezą i podawaniem etanolu, a opisywanymi w pracy metabolitami, enzymami i elektrolitami osocza krwi.

Uzasadnienie celowości podjęcia badań oraz cele szczegółowe zostały zaprezentowane w rozdziale cel i założenia pracy. Przyjęte założenie ma charakter ogólny bowiem autor zakłada, iż do badań wybrano „niektóre metabolity, enzymy oraz elektrolity, przyjmując, że mogą one ujawnić ewentualne zmiany swej koncentracji i aktywności.” Według mojej oceny, przyjęte założenie powinno być rozbudowane o wyjaśnienie jakich należy się spodziewać efektów działania analgezji oraz etanolu na badane parametry krwi.

Rozdział „Materiał i metody” został napisany w sposób poprawny. W każdej pracy eksperymentalnej, ważne jest to, aby opis eksperymentu był wystarczający do jego odtworzenia. Dlatego, istotne byłoby wyjaśnienie kilku kwestii. Pierwsza dotyczy sposobu pojenia myszy etanolem. Myszy pojono przy pomocy pipety automatycznej. Podawano im dość duże objętości roztworu – według Autora 500 μ l na osobnika. Stąd pytanie. **Czy w jakiś sposób monitorowano połykanie roztworu? Czy myszy zawsze połykały taką samą ilość roztworu? Czy w ciągu 21 dni pojenia odnotowano objawy obniżonej kondycji zdrowotnej, bądź śmierć zwierząt? Ponadto brakuje informacji jaki był przedział i średnia masa ciała zwierząt. Autor nie podaje jaka była dawka etanolu w przeliczeniu na masę ciała, a jedynie jego stężenie w podawanym roztworze. Proszę o wyjaśnienie tych nieścisłości.**

Metody statystyczne zostały dobrze dobrane i przeprowadzone. Proszę jedynie wyjaśnienie jaki test użyto w analizie *post hoc*.

Wyniki badań zostały zebrane w rozdziale zatytułowanym „Zestawienie i omówienie wyników”. Autor przedstawił wyniki w sposób precyzyjny w postaci tabel, wykresów i opisu w tekście. Szczegółowe wyniki analizy statystycznej zostały zebrane na końcu rozdziału, w postaci tabel, które zawierają wyniki analizy wariancji, wartości współczynnika korelacji pomiędzy badanymi wskaźnikami fizjologicznymi oraz poziomy istotności różnic. Jest to interesujące zestawienie podnoszące wartość pracy. Rozdział opisujący wyniki zasługuje także na kilka krytycznych uwag. Zdziwienie budzi to, że Autor nie podał wartości odchyłeń standardowych lub błędu standardowego średniej. Podpisy tabel wprowadzają czytelnika w błąd, iż wartości odchylenia standardowego w tabelach się znajdują. Próżno również szukać wartości odchyłeń w tekście, jak i na wykresach. Odchylenie standardowe jest matematycznym wyrazem zmienności szeregu statystycznego. W przypadku tych badań mogłoby posłużyć jako matematyczny opis zróżnicowania wyselekcjonowanych cech fizjologicznych. W tekście opisującym wyniki, Autor z reguły nie podawał jednostek aktywności enzymatycznej lub stężenia metabolitów oraz elektrolitów. Dobrze, że jednostki

zostały zawarte w opisach tabel. Zastrzeżenia budzi mało naukowy język. Zamiast pisać „z danych w tabeli widać” albo „ujawniono, że..” Autor mógłby napisać .. otrzymane wyniki wykazują, że... .

Dyskusja została napisana na 29 stronach. Po dyskusji został zamieszczony rozdział pt. „Uwagi ogólne” o objętości 7 stron, który w zasadzie jest jej przedłużeniem. Dyskusja została napisana według podobnego schematu co wstęp i wyniki. Można zatem stwierdzić, że cała praca została napisana konsekwentnie według uporządkowanego planu. Autor przeprowadził dyskusję dla każdego z badanych wskaźników fizjologicznych z osobna, w oddzielnych podrozdziałach. Należy stwierdzić, że dyskusja została napisana poprawnie z wykorzystaniem najnowszej literatury naukowej. Układ dyskusji, który Autor przyjął utrudnił mu jednak omówienie wzajemnych zależności pomiędzy fizjologicznymi wskaźnikami, których pomiary wykonano w tej pracy. Analiza tych zależności została natomiast przedstawiona w rozdziale „Uwagi ogólne”. Jest to ciekawe i twórcze podejście zasługujące na pozytywną ocenę. Trzeba również stwierdzić, że przeprowadzenie dyskusji po zbadaniu tak dużej liczby różnorodnych wskaźników musiało być zadaniem trudnym, z którym Autor poradził sobie dobrze. Z racji obowiązku spoczywającego na recenzencie muszę wskazać kilka słabszych elementów, które znajdują się w tym rozdziale. Pierwsza uwaga dotyczy skłonności Autora do dygresji i odchodzenia od tematyki pracy. Dyskusja rozpoczyna się dwustronicowym wprowadzeniem, moim zdaniem niepotrzebnym, w którym Autor pisze o odkryciu tlenu i wodoru oraz podaje kilka oczywistych informacji o reakcjach utleniania i redukcji. Później przechodzi do opisu powstawania wolnych rodników i funkcji antyoksydantów. Autor opisuje także wpływ etanolu na równowagę oksydacyjno-redukcyjną, czyli podaje informacje, które powinny być umieszczone we wstępie.

W dyskusji Autor przedstawia ciekawą myśl, że zróżnicowanie genetyczne myszy, pod względem wrażliwości na ból, miało wpływ na stężenie metabolitów w osoczu krwi, na przykład kreatyniny czy triacylogliceroli, i że zwierzęta o różnej wrażliwości na ból, mogą wykazywać zróżnicowane tempo metabolizmu. Potwierdzają to wyniki badań nad aktywnością aminotransferazy alaninowej, aminotransferazy asparaginowej, dehydrogenazy mleczanowej, kinazy kreatynowej. To ciekawa próba wyjaśnienia metabolicznego tła analgezji. Jej wartość niestety obniża brak odwołania do literatury i brak pogłębienia myśli w kluczowych fragmentach w dyskusji. Jeśli prezentuje się tak ciekawą sugestią, to trzeba znaleźć informacje literaturze, które chociażby w sposób pośredni mogły potwierdzić sposób rozumowania Autora. Zamiast podjąć próbę pogłębienia interpretacji w oparciu o literaturę Autor stawia pytania.

Niektóre próby interpretacyjne mogą budzić zastrzeżenia. Autor napisał np., że niższa aktywność cholinesterazy we krwi myszy o wysokim poziomie analgezji wynika z wysokiego tempa zużywania się tego enzymu przy hydrolizie acetylocholino. Powstaje jednak pytanie, czy oznaczenie aktywności cholinesterazy we krwi, wystarcza do oceny przebiegu precyzyjnych mechanizmów związanych z odczuwaniem bólu? Wprawdzie Autor to rozumie, bo zastrzega, iż jest to tylko sugestia interpretacyjna. Szkoda tylko, że nie odniósł się do literatury na temat roli acetylocholino i cholinesterazy w reakcjach związanych z bólem. Podobnie, czy niższa aktywność kinazy kreatynowej u myszy reagujących szybciej na ból oznacza, że enzym ten bardziej intensywnie uczestniczy w przemianach fosfokreatyny? W obu podanych przeze mnie przykładach Autor opiera swoją interpretację, na założeniu, że zasoby niektórych enzymów mogą się szybciej wyczerpywać, np. kinazy kreatynowej albo cholinesterazy, u myszy odczuwających ból. Jednak w tym eksperymencie myszy nie były wystawiane na działanie bólu, zatem o wyczerpywaniu zasobów enzymów pod wpływem bólu nie mogło być mowy. Mam również pytanie związane z interpretacją wyników.

Autor w niektórych miejscach pracy pisze, że myszy analgetyczne wykazują wyższą wrażliwość na ból a w innych, że wolniej na ból reagują. Czy można uznać, że tempo reakcji na ból to samo co wrażliwość na ból?

Wnioski zostały zaprezentowane po dyskusji. Większość wniosków znajduje uzasadnienie w wynikach, oraz w interpretacji wyników zaprezentowanej w dyskusji. W tej części pracy również można znaleźć pewne uchybienia. Wniosek trzeci jest zwykłym powtórzeniem wyników, a we wniosku ósmym Autor wychodzi poza zakres badań, które prowadził, pisząc, że szybkość i siła reakcji bólowych są podatne na modyfikacje przy udziale czynników środowiskowych, np. oddziaływania przyjmowanego etanolu. Autor nie może stawiać takiego wniosku bo nie prowadził badań nad siłą i szybkością reakcji bólowej. Prawdą jest natomiast to, co w zasadzie wynika z wniosków, ale powinno być mocniej podkreślone, że myszy o zróżnicowanej wrażliwości na ból wykazują również zróżnicowanie pod względem tempa metabolizmu energetycznego, oraz że tempo przemian metabolicznych może być zmienione pod wpływem etanolu.

Podsumowując ocenę pracy doktorskiej Pana lek. dent. Krzysztofa Wróbla należy stwierdzić, że zawiera ona mocne i słabsze strony. Do stron słabszych zaliczam brak uzasadnienia wyboru wskaźników fizjologicznych, które zostały wybrane do badań; niedopracowanie rozdziału wyniki – szczególnie brak wartości odchyłeń standardowych; zbyt ogólną interpretację, w niektórych fragmentach dyskusji. Można mieć również zastrzeżenia do mało precyzyjnego języka, którym Autor się posługuje. Mocne strony to ciekawy temat

badawczy o wysokiej wartości poznawczej. Bardzo dużą wartością pracy jest wykazanie, że niektóre przemiany metaboliczne u myszy wyselekcjonowanych po kątem analgezji mogą przebiegać w innym tempie niż u myszy nie poddanych selekcji. Nie można również pominąć dużego nakładu pracy, który Autor musiał włożyć w wykonanie bardzo licznych analiz. Pragnę również podkreślić, że większość zgłoszonych zastrzeżeń dotyczy błędów drobnych, które można łatwo poprawić przed opublikowaniem pracy. Błędy interpretacyjne najprawdopodobniej są wynikiem niezbyt precyzyjnego sposobu pisania. Braki w metodyce, czy w rozdziale prezentującym wyniki są zapewne wynikiem zwykłego przeoczenia, które miało prawo się zdarzyć w tak obszernej pracy.

Według mojej oceny, praca doktorska pt. „Zmienność wybranych wskaźników fizjologicznych osocza krwi na modelu mysim zjawiska analgezji, generowana alkoholem etylowym” napisana przez Pana lek. dent. Krzysztofa Wróbla spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim w ustawie o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki. W związku z tym wnoszę do Wysokiej Rady Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi o dopuszczenie Pana Krzysztofa Wróbla do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



dr hab. Grzegorz Formicki