

Prof. dr hab. Kornelia Kędziora-Kornatowska

Kierownik Katedry i Kliniki Geriatrii

Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu

Collegium Medicum w Bydgoszczy

**Ocena
rozprawy doktorskiej mgr Natalii Cichoń pt.:**

**„Wpływ magnetoterapii na parametry stresu oksydacyjnego i poprawę neuroplastyczności
u pacjentów po udarze niedokrwiennym”**

wykonanej w Katedrze Biochemii Ogólnej Uniwersytetu Łódzkiego

promotor: dr hab. Joanna Saluk-Bijak prof. nadzwyczajny Uniwersytetu Łódzkiego

promotor pomocniczy: dr hab. Michał Bijak

Choroby naczyniowe ośrodkowego układu nerwowego to bardzo istotny problem zdrowotny społeczeństw w XXI wieku. Udar mózgu w krajach wysokorozwiniętych, w tym w Polsce jest trzecią co do częstości przyczyną zgonów oraz główną przyczyną niepełnosprawności. Skala problemu może ulec nasileniu między innymi w kontekście postępującego demograficznego starzenia się. Wyniki badań prowadzonych w ostatnich latach potwierdzają istotne znaczenie stresu oksydacyjnego w etiopatogenezie udaru mózgu. Reaktywne formy tlenu odgrywają istotną rolę w uszkodzeniach tkanek zarówno w udarze niedokrwiennym, jak i w krwotocznym. Leczenie udaru niedokrwiennego polega na zastosowaniu terapii, która prowadzi do poprawienia perfuzji mózgu w obszarze objętym niedokrwieniem, a także terapii zmniejszającej skutki udaru. W procesie leczenia istotną rolę odgrywa wczesna rehabilitacja. Stosowane są różne metody rehabilitacji pacjentów po udarach niedokrwiennych, w procesie tym ważne są także zabiegi fizykoterapeutyczne, w tym magnetoterapia. Biorąc pod uwagę istotny udział stresu oksydacyjnego w patomechanizmie udaru niedokrwiennego mózgu przedmiotem wielu badań jest analiza związku między stosowanymi metodami rehabilitacji poudarowej, w tym magnetoterapii a poprawą stanu funkcjonalnego pacjentów, oraz wpływem pola elektromagnetycznego o niskiej częstotliwości na parametry pro- i antyoksydacyjne.

W ten interesujący nurt badań wpisuje się tematyka badawcza podjęta przez mgr Natalię Cichoń.

Rozprawa doktorska mgr Natalii Cichoń ma układ typowy dla prac doktorskich przedstawianych w formie cyklu publikacji i obejmuje: wykaz publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej, pozostały dorobek naukowy, następnie w języku polskim i angielskim streszczenie, cel pracy, materiał i metody, wyniki, podsumowanie i wnioski. W kolejnej części rozprawy zawarto publikacje będącą podstawą rozprawy doktorskiej oraz oświadczenia współautorów o udziale procentowym Doktorantki w publikacjach.

Tytuł rozprawy doktorskiej odpowiada tematyce wskazanych przez Doktorantkę publikacji. W skład rozprawy doktorskiej wchodzi sześć spójnych tematycznie publikacji opublikowanych w latach 2016-2018 w czasopismach z listy filadelfijskiej: w tym jedna praca przeglądowa opublikowana w *Biologia* oraz pięć prac oryginalnych opublikowanych w *Bioelectromagnetics Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, *Advances in Clinical and Experimental Medicine*, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* oraz *Frontiers in Aging Neuroscience*. Łączny współczynnik Impact Factor wskazanych publikacji wynosi 14,037 (IF 5-letni 14,810), a liczba punktów MNiSW – 145. Całość uzupełnia wykaz pozostałego dorobku naukowego (publikacje pełnotekstowe, rozdziały w monografiach) o sumarycznej punktacji: 269 punktów MNiSW oraz IF=22,848 (IF 5 letni 23,710).

Ponadto Doktorantka była współautorem 15 komunikatów zjazdowych, przy czym w 11 była pierwszym autorem. We wszystkich publikacjach składających się na rozprawę doktorską Doktorantka jest pierwszym autorem, a jej wkład autorski wynosi 35% w jednej publikacji, 30% w trzech publikacjach oraz 25% w dwóch publikacjach. Z oświadczeń współautorów prac składających się na rozprawę doktorską wynika, że mgr Natalia Cichoń była autorką koncepcji projektu badawczego, ponadto jej udział polegał na gromadzeniu, przygotowywaniu i interpretacji danych, wykonaniu części eksperymentalnej oraz przygotowaniu artykułu do opublikowania. Z uwagi na fakt, że wskazane publikacje składają się na rozprawę doktorską były poddane wcześniej ocenie przez redakcję czasopism i niezależnych recenzentów, swoją opinię skoncentrują na ocenie spójności uzyskanych wyników z danymi opublikowanymi w załączonych publikacjach. Tytuł rozprawy jest w pełni adekwatny do zawartych w niej wyników.

W części streszczenia „Wstęp” Autorka rozprawy przedstawiła w zwięzły sposób definicję oraz epidemiologię udaru niedokrwiennego mózgu. Podkreśla, że uszkodzenie tkanki mózgowej skorelowane jest z wystąpieniem kaskady ischemicznej powstałej w wyniku reperfuzji. W konsekwencji dochodzi do wystąpienia stresu oksydacyjnego będącego następstwem hipoksji o kluczowej roli w patomechanizmie udaru niedokrwiennego mózgu. W kolejnej części „Wstępu” Doktorantka wskazuje na istotną rolę, ze względu na dużą plastyczność mózgu, natychmiastowej i długofalowej rehabilitacji w celu zmniejszenia deficytu neurobiologicznego. Następnie Autorka w sposób syntetyczny charakteryzuje zjawisko kompensacyjnej plastyczności uszkodzonego mózgu. Podkreśla, że prawidłowo przeprowadzona rehabilitacja jest jedną z najważniejszych form terapii poudarowej. Doktorantka charakteryzuje zabiegi z wykorzystaniem pola elektromagnetycznego o niskiej częstotliwości jako jedną z metod fizjoterapeutycznych wykorzystywanych w terapii

poudarowej. Doktorantka podkreśla, że istnieją tylko nieliczne i niespójne dane dotyczące wykorzystania magnetoterapii jako formy terapii antyoksydacyjnej u pacjentów po udarze niedokrwiennym mózgu. W podsumowaniu tej części pracy należy stwierdzić, że jest ona napisana w sposób niezwykle rzeczowy i przemyślany, zgodnie z aktualnym stanem wiedzy w tym zakresie.

Celem pracy było poznanie mechanizmów działania pola elektromagnetycznego o niskiej częstotliwości, stosowanego w rehabilitacji pacjentów po udarze niedokrwiennym mózgu oraz analizie uzyskanych efektów biologicznych skorelowanych z poprawą stanu funkcjonalnego pacjentów. Autorka wskazuje, że cel ten został osiągnięty poprzez:

- analizę porównawczą parametrów stresu oksydacyjnego we krwi pacjentów rehabilitowanych po udarze niedokrwiennym mózgu, przy zastosowaniu różnych metod fizjoterapeutycznych
- porównanie ekspresji genów oraz odpowiadających im produktów białkowych, przeprowadzone dla substancji uczestniczących w procesach neuroplastyczności w grupie rehabilitowanych z i bez zastosowanej magnetoterapii
- określenie związku pomiędzy stanem funkcjonalnym pacjentów a wynikami uzyskanymi w analizie parametrów biochemicznych.

Należy stwierdzić, że Doktorantka poprawnie sformułowała cel pracy, a także metody w jaki sposób cel ten został osiągnięty.

W kolejnej części rozprawy Doktorantka szczegółowo scharakteryzowała materiał i metody. Materiał do badań stanowiło 251 próbek krwi obwodowej pobranych łącznie od 105 pacjentów po przebytych udarze niedokrwiennym mózgu, poddanych rehabilitacji poudarowej w Oddziale Rehabilitacji Neurologicznej Miejskiego Centrum Medycznego im. dr Karola Jonschera w Łodzi. Pacjenci zostali podzieleni losowo na dwie grupy: badaną, obejmującą 48 pacjentów, oraz kontrolną stanowiącą 57 pacjentów. Pacjenci byli w przedziale wiekowym 45-70 lat. Obydwie grupy chorych były rehabilitowane przez 4 tygodnie według tego samego programu obejmującego dziennie: ćwiczenia aerobowe, terapię neurofizjologiczną oraz psychoterapię. Dodatkowo grupa badana poddana była rehabilitacji z wykorzystaniem pola elektromagnetycznego o niskiej częstotliwości. Zabiegi były wykonywane z wykorzystaniem urządzenia Magnetronik MF 10 firmy E i E Elektronika i Elektromedycyna OTWOCK. Pacjenci z grupy badanej poddani byli standardowym 10 zabiegom. Doktorantka szczegółowo przedstawiła kryteria włączenia i wykluczenia z badań. Pacjenci zostali poddani badaniom internistycznym i neurologicznym. W badaniach wykorzystano do oceny stanu funkcjonalnego skalę Barthel ADL oraz zmodyfikowaną skalę Rankina. Ocenę funkcji poznawczych wykonano z wykorzystaniem skali MMSE (MiniMental State Examination), natomiast do oceny nastroju skalę GDS (Geriatric Depression Scale). Materiał badawczy stanowiła krew pełna pobierana na CPDA1. Krew do badań zarówno w grupie kontrolnej jak i badanej pobierana była dwukrotnie: przed rozpoczęciem serii zabiegów rehabilitacyjnych oraz po standardowej serii 10 zbiegów magnetoterapii (lub pozoranej ekspozycji). W przypadku wybranych oznaczeń krew pobierano także po 20

zabiegach. Doktorantka oznaczyła następujące parametry stresu desydacyjnego: aktywność katalazy (CAT) (metodą Aebięgo), dysmutazy ponadtlenkowej (SOD) (z wykorzystaniem zestawu Randox Superoxiole Dismutase Randsod), ponadto określała w krwi pełnej ekspresję mRNA genów kodujących enzymy antyoksydacyjne (CAT, SOD1, SOD2, GPx1, GPx4) metodą Real Time PCR, oceniano także całkowity potencjał antyoksydacyjny (TAS), poziom oksydacyjnych uszkodzeń białek osocza poprzez pomiar stężenia grup tiolowych (metodą Ellmana) i grup karbonylowych (metodą immunoenzymatyczną). Perokrydacja lipidów oceniona została na podstawie stężenia związków reagujących z kwasem tiobarbiturowym (TBARS). W badaniach oceniono także parametry stresu nitracyjnego i metabolizmu tlenu azotu (NO): oznaczono w osoczu metodą immunoenzymatyczną stężenie 3-nitrotyrozyny (3-NT) będącej markerem oksydacyjnych i nitracyjnych uszkodzeń białek wywołanych działaniem NO, oznaczono także stężenie końcowych metabolitów NO tj. azotanów i azotynów (metodą kolorymetryczną opartą na reakcji Griessa).

Ponadto badano wpływ pola elektromagnetycznego (PEM) o niskiej częstotliwości na syntezę NO zależną od syntazy tlenu azotu (NOS). We krwi pełnej dokonano pomiaru ekspresji mRNA genu NOS2 kodującego indukowalną syntazę tlenu azotu (iNOS). Badano także osoczowe stężenie TNF α (zestaw Human TNF-alpha Elisa development Kit MABTECH) jako markera potencjalnego stanu zapalnego. Oznaczona także czynniki uczestniczące w mechanizmach neuroplastyczności: osoczowe stężenie neurotroficznego czynnika pochodzenia mózgowego (BDNF) (zestaw BDNF ELISA kit Ab cam) oraz poziom ekspresji genu BDNF metodą Real Time PCR, osoczowe stężenie naczyniowo-śródbłonkowego czynnika wzrostu (VEGE) (zestaw VEGF Human ELISA Kit Invitrogen). Ponadto oznaczono także grupę cząstek, które także mogą mieć wpływ na proces neuroplastyczności: czynnik wzrostu hepatocytów (HGF), czynnik wzrostowy w szpiku kostnym dla prekursorów limfocytów (SDF-1 α) oraz czynnik hamujący białaczkę (LIF), a także czynnik wzrostu nerwów (NGF β), który należy do grupy klasycznych neurotrofin. Oznaczenia wykonano wysoce czułą metodą immunoenzymatyczną z wykorzystaniem systemu 5-Plex Luminex.

Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej, w której dobór zastosowanych narzędzi należy uznać za właściwy. Wszystkie procedury z użyciem materiału od pacjentów zostały przeprowadzone za zgodą Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Łódzkiego (nr 28/KBBN-UŁ/I/2015 oraz 13/KBBN-UŁ/II/2016).

W podsumowaniu tej części rozprawy uważam, że zarówno materiał badawczy, jak i zastosowane metody zostały opisane w sposób wyczerpujący i bardzo szczegółowy. Zastosowane kryteria włączenia, a także wykluczenia z badań są odpowiednie i zgodne z założonymi zadaniami badawczymi. Jedyną uwagą w tej części pracy jest zastosowanie Geriatrycznej Skali Oceny Depresji GDS u wszystkich osób z badanej grupy, to narzędzie badawcze zaleca się stosować powyżej 55 roku życia, czyli w okresie przedstarości i starości. Rozdział „Wyniki” obliguje recenzenta do weryfikowania informacji w nim zawartych z danymi opublikowanymi w poszczególnych pracach stanowiących podstawę rozprawy

doktorskiej. Doktorantka uzyskała szereg interesujących wyników nie tylko o znaczeniu naukowym, ale także wartości w praktyce klinicznej.

W rozdziale „Podsumowanie” Doktorantka podkreśla, że wyniki przeprowadzonych badań zarówno w zakresie parametrów stresu oksydacyjnego, parametrów stresu nitracyjnego, a także w zakresie oznaczonych czynników uczestniczących w mechanizmach neuroplastyczności wskazują na zasadność włączenia magnetoterapii w zakres standardowej terapii rehabilitacyjnej po udarze. Szkoda, że w rozprawie doktorskiej Doktorantka pominęła rozdział „Dyskusja”, w którym mogłaby wykazać się doskonałą znajomością literatury przedmiotu, dojrzałością naukową i umiejętnością kompleksowej interpretacji uzyskanych wyników przedstawionych i dyskutowanych w poszczególnych pracach.

Autorka sformułowała trzy wnioski, które w pełni odpowiadają na zadania badawcze postawione w celu pracy.

W podsumowaniu, uważam że badania stanowiące podstawę rozprawy doktorskiej mgr Natalii Cichoń zostały bardzo starannie zaplanowane, a uzyskane wyniki są oryginalne i interesujące, o istotnym znaczeniu naukowym i klinicznym. Przedstawione w recenzji nieliczne uwagi nie umniejszają mojej wysokiej oceny pracy.

Rozprawę doktorską mgr Natalii Cichoń oceniam w pełni pozytywnie. Doktorantka wykazała się dużą wiedzą teoretyczną oraz umiejętnością samodzielnego rozwiązywania problemu badawczego. Rozprawa spełnia aktualnie obowiązujące warunki ustawowe, jakim powinna odpowiadać rozprawa doktorska.

W oparciu o powyższą opinię mam zaszczyt zwrócić się do Wysokiej Rady Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie Pani mgr Natalii Cichoń do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie biorąc pod uwagę kompleksowość prowadzonych badań, wartość merytoryczną uzyskanych wyników i możliwości wdrożeniowe oraz nowatorski charakter rozprawy wnioskuję o jej wyróżnienie.

KIEROWNIK
Katedry Geriatrii
i Kliniki Geriatrii

prof. dr hab. Kornelia Kędziora-Kornatowska

Bydgoszcz, 28.03.2019 r.

prof. dr hab. Kornelia Kędziora - Kornatowska

