

Prof. dr hab. Kazimierz Głowniak
Kierownik Katedry Kosmetologii
Kolegium Medycznego
Wyższej Szkoły Informatyki i Zarządzania
w Rzeszowie

OCENA

Rozprawy doktorskiej mgr farmacji Kingi Krzysztoforskiej p.t. "Behawioralne i biochemiczne efekty działania kwasu protokatechowego na procesy pamięciowe u szczurów" wykonanej pod kierunkiem Prof. dr hab. Ewy Widy-Tyszkiewicz w Katedrze i Zakładzie Farmakologii Doświadczalnej i Klinicznej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego.

Obserwowane w ostatnich latach zjawisko starzenia się społeczeństwa w Polsce jest procesem postępujących wraz z wiekiem przemian fizjologicznych jak i zdolności intelektualnych. Jest ono w dużej mierze wynikiem zmniejszonej zdolności organizmu człowieka do odpowiedzi na stres środowiskowy, w tym na stres oksydacyjny wywołany przez reaktywne formy tlenu. Wraz z wiekiem zmniejszające się naturalne mechanizmy obronne w formie enzymatycznej (katalaza, glutation, reduktaza glutationowa, dysmutaza ponadtlenkowa), okazują się niewystarczające. Muszą być więc uzupełniane przez naturalne antyoksydanty - metabolity wtórne roślin, jakimi są związki polifenolowe w tym flawonoidy, glikozydy antocjanowe czy fenolokwasy.

Jednym z głównych przedstawicieli kwasów fenolowych, pochodnych kwasu benzoowego występującym w wielu gatunkach roślin leczniczych i jadalnych jest kwas protokatechowy (PCA). Jest on jednocześnie głównym produktem metabolizmu glikozydów antocyjanowych ulegających biodegradacji w przewodzie pokarmowym z udziałem mikroflory jelitowej i wchłanianym do krwioobiegu metabolitem, odpowiedzialnym za działanie antyoksydacyjne.

Kwas protokatechowy (kwas 3,4 dihydroksybenzoowy) podobnie jak inne fenolokwasy pochodne kwasu benzoowego, występuje w surowcach roślinnych w niewielkich ilościach, stąd też cenne są produkty spożywcze (kolorowe owoce, kwiaty, warzywa) zawierające znaczne ilości antocyjanów, które w organizmie człowieka ulegają biotransformacji do kwasów fenolowych, w tym do kwasu protokatechowego.

Badania prowadzone w ciągu kilkunastu ostatnich lat dotyczące potwierdzonego w licznych pracach eksperymentalnych działania antyoksydacyjnego, wykazały również wielokierunkowe działanie przeciwzapalne, hipotensyjne i przeciwcukrzycowe kwasu protokatechowego. Na podkreślenie zasługują szeroko cytowane przez autorkę dysertacji, prowadzone w wielu ośrodkach naukowych badania nad aktywnością neuroprotektynną i prokognitywną kwasu protokatechowego.

Wielokierunkowe badania prowadzone w zespole Prof. dr hab. Ewy Widy-Tyszkiewicz realizowane częściowo w ramach projektu finansowanego przez MNiSW (Nr 1 M9/PM2/18), dotyczą wpływu

długotrwałego podawania kwasu protokatechowego na procesy uczenia się i pamięci szczurów. Wyniki tych badań, realizowanych z udziałem mgr Kingi Krzysztoforskiej zostały przedstawione w formie trzech prac doświadczalnych, opublikowanych w *Nutritional Neuroscience* (2019,2020) oraz w *Behavioral Brain Research* (2019) o łącznej wartości współczynnika IF = 11,033

Mgr Kinga Krzysztoforska jest pierwszym autorem tych zespołowych publikacji. Wybór tak specjalistycznych czasopism, które opublikowały uzyskane wyniki badań, świadczy o innowacyjności i istotnej wartości poznawczej prezentowanych badań, aktualnej, trafnie dobranej tematyce, oraz uznanym warsztacie badawczym. Metodyka i wyniki przedstawionych badań zostały już pozytywnie ocenione przez recenzentów czasopism w których się ukazały. Badania prowadzone nad behawioralnymi i neurochemicznymi efektami działania kwasu protokatechowego. Autorka prezentowała również w formie ustnych wystąpień na trzech krajowych konferencjach naukowych.

Przedstawiona do oceny praca doktorska p.t.: "Behawioralne i biochemiczne efekty działania kwasu protokatechowego na procesy pamięciowe u szczurów", wykonana pod kierunkiem prof. dr hab. Ewy Widy-Tyszkiewicz, zawiera wyniki rozszerzonych badań wpływu długotrwałego podawania kwasu protokatechowego na procesy pamięciowe, oraz neuroprzewodnictwo jako biochemiczne podłoże procesów poznawczych. Brak w dostępnej literaturze szerszych publikacji, przedstawiających badania wpływu długotrwałego podawania kwasu protokatechowego zwierzętom na procesy zapamiętywania, uczenia się oraz na neuroprzebieżność w OUN stanowiące biochemiczne podłoże procesów poznawczych w pełni uzasadnia celowość podjęcia takich badań jako temat rozprawy doktorskiej.

Wybór tematu rozprawy doktorskiej uważam za bardzo trafny. Wpisuje się on w obecne trendy poszukiwania i stosowania w terapii oraz profilaktyce, związków czynnych zawartych w substancjach pochodzenia roślinnego.

Oceniana dysertacja ma typowy układ, praca podzielona jest na część teoretyczną obejmującą obszerny wstęp, jasno określone założenia i cel pracy, oraz część praktyczną obejmującą materiał i metodykę badań, uzyskane wyniki i bardzo szeroką, szczegółową dyskusję zakończoną wnioskami.

Wstęp

W obszernym wstępie autorka przedstawia w oparciu o bogatą aktualną literaturę, ryzyko występowania zaburzeń poznawczych typowych dla wieku podeszłego, obejmujących upośledzenie pamięci i ograniczone zdolności do koncentracji uwagi. W oddzielnych podrozdziałach szczegółowo omawia anatomiczne i biochemiczne podłoże pamięci.

Na uwagę zasługują przejrzyste opisane testy behawioralne i graficznie przedstawione schematy zestawów aparatury wykorzystanej, do przeprowadzania testów behawioralnych, służących do oceny uczenia się i pamięci szczurów.

Część teoretyczną zamyka rozdział "Założenia i cel pracy". W rozdziale tym Autorka mając na uwadze związane z wiekiem zaburzenia poznawcze, uznaje za celowe poszukiwanie skutecznego leku wspomagającego funkcje poznawcze, zaburzone u osób w podeszłym wieku. Wybór kwasu protokatechowego uzasadnia opisanym w literaturze wielokierunkowym działaniem biologicznym: antyoksydacyjnym, przeciwzapalnym, przeciwnowotworowym i neuroprotektynowym tego związku. Jako temat pracy podejmuje więc nieopisany dotąd wpływ długotrwałego podawania PCA szczurom,

na procesy pamięciowe takie jak zapamiętywanie, uczenie się, oraz na neuroprzewodnictwo w OUN i biochemiczne podłoże procesów poznawczych. Sformułowane cele badawcze mogą dać odpowiedź na pytania: Czy kwas protokatechowy wpływa korzystnie na przebieg procesów pamięciowych szczurów zdrowych, a także szczurów poddanych eksperymentalnemu upośledzeniu funkcji poznawczych. Odpowiedzi na te pytania miały udzielić zaplanowane jako cele szczegółowe, badania wpływu długoterminowego podawania PCA szczurom, na stężenie neuroprzekaźników w wybranych strukturach układu nerwowego (kora przedczołowa, hipokamp, prążkowie, podwzgórze, mózdzek, rdzeń przedłużony, rdzeń kręgowy). W tym celu Autorka oznaczyła chromatograficznie poziomy monoamin biogennych i wybranych aminokwasów w strukturach nerwowych szczurów zdrowych oraz szczurów poddanych badaniom w D-galaktozowym modelu upośledzenia pamięci.

Część doświadczalna

Do przeprowadzenia badań procesów pamięciowych oraz oceny skuteczności PCA Doktorantka wybrała zwierzęcy model upośledzenia funkcji poznawczych jakim jest D-galaktozowy model upośledzenia pamięci, opisany przez Klinkeberga i Broklanda w roku 2010. Zastosowanie tego modelu, w którym podaje się szczurom drogą doustną D-galaktozę w ilości 100 mg/kg przez okres 6 tygodni, pozwala wywołać behawioralne i neurochemiczne zmiany świadczące o upośledzeniu procesów badawczych. W części doświadczalnej pracy (materiały i metody), Autorka w sposób przejrzysty przedstawiła przemyślane i szczegółowo zaplanowane na okres 48 dni badania na szczurach, wymagające doboru młodych zwierząt o określonej wadze, podzielonych w sposób randomizowany na grupy (10 osobników), oraz doboru dawek PCA i D-galaktozy, a także drogi podania tych związków badanym zwierzętom.

Na uwagę zasługuje przedstawiony graficznie (ryc 3-1) harmonogram zaplanowanych na 48 dni a następnie przeprowadzonych badań behawioralnych, mających na celu ocenę wpływu PCA na procesy pamięciowe szczurów zdrowych, oraz równoległe szczurów użytych w modelu upośledzenia pamięci, wywołanym doustnym podaniem D-galaktozy. Należy podkreślić, iż przebieg testów behawioralnych był rejestrowany przez umieszczenie nad aparaturą testową kamery, sprzężonej z komputerowym systemem wizualnej obserwacji ruchu szczurów, ich reagowania i czasu przebywania w poszczególnych kwadratach labiryntu wodnego. Po przeprowadzeniu badań behawioralnych (test otwartego pola Morrisa, test rozpoznawania nowego obiektu, test labiryntu wodnego - WMW) Autorka przeprowadziła badania biochemiczne. Należy podkreślić szeroki zakres zaplanowanych i przeprowadzonych badań biochemicznych, obejmujących oznaczenie stężeń monoamin a także wybranych aminokwasów, z wykorzystaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej (RP-HPLC-EP) według metody opisanej przez Widy-Tyszkiewicz i współpracowników. Przeprowadzone badania wymagały właściwego przygotowania próbek, wykorzystanych do badań chromatograficznych (pobranie struktur anatomicznych, zamrożenie -80 st.C., homogenizacja z dobranymi rozpuszczalnikami, filtrowanie, a także dobór fazy ruchomej, kolumny C-18 oraz szybkości przepływu). Oznaczanie stężeń aminokwasów w układzie (RP-HPLC-EP), wymagało przeprowadzenia ich przedkolumnowej derywatywacji, z zastosowaniem dialdehydu ftalowego celem ich przeprowadzenia w elektroaktywne, stabilne formy. Uzyskane wyniki zostały poddane analizie wariancji (ANOVA) pozwalającej na ustalenie zależności pomiędzy zmiennymi, przez obliczenie współczynników korelacji liniowej Pearsona. Uzyskane wyniki zostały przedstawione w załączonych tabelach oraz na schematach słupkowych ułatwiających ich interpretację.

Wyniki

Wyniki uzyskane w toku przeprowadzonych w części doświadczalnej badań zostały przedstawione na 94 stronach dysertacji w sposób przejrzysty udokumentowane rycinami (103 ryciny) przedstawionymi w formie wykresów. Dane liczbowe zamieszczone w 28 tabelach, zostały dodatkowo zilustrowane w formie wykresów słupkowych, przedstawiających graficznie statystycznie istotne różnice pomiędzy uzyskanymi wynikami w badanych grupach zwierząt.

Przedstawione badania behawioralne, zostały dodatkowo udokumentowane zdjęciami "map termicznych" przedstawiających czas spędzony przez grupy badanych zwierząt w poszczególnych częściach basenu, w pierwszym (ryc. 4.16, 4.64) i w drugim (ryc. 4.26, 4.69) teście pamięci, przeprowadzonym w labiryncie wodnym. Wyniki uzyskane w drugim etapie badań, który obejmował analizę biochemiczną miały dać odpowiedź, czy badane substancje (PCA i D-Galaktoza) wpływają na stężenia amin biogennych i wybranych aminokwasów, modulujących procesy poznawcze i prawidłowe funkcje OUN.

Szczegółowe wyniki zawartości monoamin biogennych i ich metabolitów w wybranych strukturach OUN (kora przedczołowa, hipokamp, prążkowie, podwzgórze, mózdzek, rdzeń przedłużony i rdzeń kręgowy), zostały przedstawione w tabeli 4.11 oraz na wykresach (ryc. 4.33 - 4.37) Wpływ PCA na stężenie i metabolizm monoamin i aminokwasów w OUN, u szczurów z upośledzeniem pamięci wywołanym podaniem D-Galaktozy zostały przedstawione w tabeli nr 4.24 i na wykresach (ryc. 4.73-4.76)

Zaplanowane przez Doktorantkę wielokierunkowe badania objęły również korelację pomiędzy wartością wskaźnika pamięci (MDI) a stężeniem badanych amin i aminokwasów, w wybranych strukturach OUN. Ustalone istotne statystycznie korelacje w teście rozpoznawania nowego obiektu, pomiędzy wskaźnikiem pamięci (MDI) a stężeniem badanych monoamin i aminokwasów, głównie w korze przedczołowej i prążkowie zostały udokumentowane w tabeli nr 4.27 i przedstawione graficznie w formie wykresów (ryc. 4.87-4.96).

Należy podkreślić, że do przeprowadzenia wielokierunkowych badań zarówno behawioralnych i biochemicznych, Doktorantka zastosowała szeroki zestaw odpowiednio dobranych metod z wykorzystaniem nowoczesnej aparatury, świadczy to o dobrym przygotowaniu do prowadzenia prac doświadczalnych.

Dyskusja

Uzyskane wyniki badań zostały szczegółowo omówione w oparciu o szeroko cytowane i dostępne w piśmiennictwie publikacje. Autorka szczegółowo omawia wyniki przeprowadzonych badań własnych w zestawieniu z licznymi doniesieniami innych autorów. Piśmiennictwo obejmuje 339 aktualnych, właściwie dobranych pozycji odpowiednio cytowanych zarówno w części teoretycznej i doświadczalnej a szczególnie w obszernej i szczegółowej dyskusji wyników. Autorka omawia i porównuje z danymi literaturowymi, wyniki badań własnych, dotyczących wpływu długotrwałego podawania PCA, na procesy pamięciowe szczurów oraz na ich aktywność eksploracyjną, w testach behawioralnych, a także na stężenie neuroprzekaźników w wybranych strukturach OUN (badania biochemiczne)

W przedstawionych na zakończenie wnioskach, Doktorantka stwierdza iż uzyskane wyniki nie potwierdzają pierwszej hipotezy badawczej, dotyczącej korzystnego wpływu długotrwałego podawania szczurom PCA w dawkach 50 mg/kg i 100 mg/kg na przebieg uczenia się, zapamiętywania i przywoływania informacji z pamięci, a także na aktywność eksploracyjną zwierząt. Natomiast przeprowadzone badania potwierdziły słuszność drugiej hipotezy badawczej dotyczącej korzystnego wpływu kwasu protokatechowego na procesy pamięciowe szczurów poddanych eksperymentalnemu upośledzeniu funkcji poznawczych w modelu D-galaktozowym.

Należy podkreślić iż Doktorantka po raz pierwszy szczegółowo przebadła wpływ długotrwałego podawania PCA na procesy pamięciowe u szczurów. Brak jest również doniesień literaturowych na temat wpływu PCA na przewodnictwo dopaminergiczne oraz stężenie histydyny w OUN zwierząt zdrowych. Uzyskane wyniki uzupełniają dotychczasowy stan wiedzy na temat korzystnego wpływu PCA na procesy poznawcze i przekąźnictwo mózgowe u szczurów w D-galaktozowym modelu upośledzenia pamięci.

Szeroko zaplanowane i szczegółowo przeprowadzone badania biochemiczne uzupełniły dotychczasowy stan wiedzy na temat mechanizmu działania D-galaktozy i wyjaśniły jej wpływ na stężenie wybranych neuroprzekąźników w OUN szczurów. Osiągnięcia te zostały uwidocznione zarówno w poprawnie zredagowanych wnioskach jak również omówione w streszczeniu pracy w języku polskim i angielskim, zamieszczonym na początku dysertacji.

W toku czytania i oceny rozprawy nasuwają się nieliczne uwagi które Autorka może wziąć pod uwagę kontynuując badania prowadzone w rozprawie doktorskiej.

1. Słaba jakość niektórych rycin (ryc. 1.4 oraz ryc. 3.2 i 3.3) przy jednocześnie poprawnym i obszernym opisie przedstawionych na rycinach testów czy aparatów.
2. Niektóre skróty literowe np. MDI, 5HIAA, ABCA1, EAAT1, LATI cytowane w tekście nie są uwidocznione w wykazie skrótów zamieszczonym na pierwszych stronach dysertacji.
3. Proszę o wyjaśnienie czy badania biochemiczne były przeprowadzone w Zakładzie Farmakologii Doświadczalnej i Klinicznej WUM, czy we współpracy z innymi laboratoriami.
4. W podsumowaniu rozdziału "Dyskusja" stwierdza Pani iż w świetle przedstawionych w dysertacji wyników, celowym wydaje się prowadzenie dalszych badań nad zastosowaniem związków polifenolowych, skutecznych we wspieraniu procesów pamięciowych i przeciwdziałaniu zmianom prowadzącym do ich upośledzenia. Czy Pani zdaniem dotyczy to innych polifenoli czy również wyciągów roślinnych bogatych w te związki?

Podsumowując ocenę rozprawy doktorskiej Pani mgr farm. Kingi Krzysztoforskiej pod tytułem: "Behawioralne i biochemiczne efekty działania kwasu protokatechowego na procesy pamięciowe u szczurów", od strony merytorycznej, **oceniam ją bardzo wysoko**. Zarówno część teoretyczna jak i przeprowadzone badania eksperymentalne zostały starannie przemyślane, szczegółowo zaprojektowane i konsekwentnie zrealizowane, a uzyskane wyniki przejrzyście przedstawione i szeroko omówione w dyskusji. Świadczy to o dobrym przygotowaniu teoretycznym i manualnym Doktorantki, umiejętności organizowania pracy badawczej oraz planowania i rozwiązywania zagadnień naukowych. Przeprowadzone badania zarówno behawioralne jak i biochemiczne prezentują wysoki poziom naukowy i dostarczają nowych istotnych danych wpływających na rozwój

badan w zakresie farmakologii doświadczalnej i analizy biochemicznej. **Wnioskuje wiec o wyroznienie ocenianej rozprawy doktorskiej.**

Pragne podkrelic, ze uzyskane wyniki maja charakter nowatorski i moga byc wykorzystane przez doktorantke jak i innych badaczy do badan nad polifenolami, celem okreslenia ich dzialania wspierajacego procesy pamieciowe.

Podsumowujac, stwierdzam, ze rozprawa doktorska mgr Kingi Krzysztoforskiej spelnia warunki okreslone w art. 187 ustawy z dn. 20 lipca 2018 r. "Prawo o szkolnictwie wyzszy i nauce (Dz.U. 2018 poz. 1668 z pozn. zm.)" W związku z powyższym zwracam się do Rady Dyscypliny Nauk Medycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego z wnioskiem o dopuszczenie mgr farm Kingi Krzysztoforskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Prof. dr hab. Kazimierz Głowniak