



INSTYTUT PSYCHIATRII I NEUROLOGII

II KLINIKA NEUROLOGICZNA



Kierownik: Prof. dr hab.n.med. Iwona Kurkowska-Jastrzębska

adres: ul. Sobieskiego 9, 02-957 Warszawa; tel. +48-22-4582537; fax:+48-22-8429322; e-mail: neuro2@ipin.edu.pl

Recenzja rozprawy na stopień doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne magister farmacji Kingi Krzysztoforskiej

pt: „Behawioralne i biochemiczne efekty działania kwasu protokatechowego na procesy pamięciowe u szczurów”

Promotor: dr hab. n. med. Ewa Widy-Tyszkiewicz

Katedra i Zakład Farmakologii Doświadczalnej i Klinicznej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego.

Przedstawiona do oceny praca została wykonana w Katedrze i Zakładzie Farmakologii Doświadczalnej i Klinicznej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego pod kierunkiem Prof. dr hab. n. med. Ewy Widy-Tyszkiewicz. Praca doktorska przedstawiona do oceny jest tradycyjnym manuskrytem obejmującym typowe części: wstęp, opis hipotez i celów badawczych, metodykę, przedstawienie wyników pracy, dyskusję oraz wnioski. Całość liczy 267 stron; obejmuje 32 tabele, 113 rycin oraz 339 pozycji piśmiennictwa oraz wszystkie wymagane załączniki.

Problem badawczy

Rozprawa podejmuje ważny temat poszukiwania nowych substancji mających wpływ na procesy pamięci, potencjalnych leków o działaniu wspomagającym pamięć i działaniu neuroprotekcijnym. Badania podjęte w pracy dotyczą jednego ze związków polifenolowych pochodzących z pożywienia roślinnego - kwasu protokatechowego (PCA) o własnościach przeciwutleniających i przeciwzapalnych. Opierając się na opisywanych w literaturze mechanizmach działania PCA Doktorantka uzasadnia w szeroki i przekonujący sposób, dlaczego podjęła się takiego zadania. PCA jest substancją o silnym działaniu antyoksydacyjnym, działając w różny sposób w zależności od modelu badawczego, np. podnosi stężenie glutationu, nasila aktywność katalazy, dysmutazy ponadtlenkowej oraz oksygenazy hemowej-1 oraz powoduje zmniejszenie peroksydacji lipidów (zmniejszenie stężenia dialdehydu malonowego). PCA ma również działanie przeciwzapalne: hamuje wytwarzanie cytokin prozapalnych, takich jak: TNF- α i IL-1 β , mediatorów reakcji zapalnej, np.NO i prostaglandyny E2 (PGE2), hamuje ekspresję genów dla syntazy tlenku azotu (iNOS) i cyklooksygenazy-2 (COX-2), a także hamuje ścieżki sygnałowe poprzez NF- κ B i kinazy MAPK. Wykazano, że PCA wchłania się w przewodzie pokarmowym

i penetruje do ośrodkowego układu nerwowego, wywołując w/w efekty w komórkach nerwowych i gleju. Zarówno działanie przeciwzapalne jak również antyoksydacyjne jest uważane za potencjalnie neuroprotektoryjne w przypadku chorób neurodegeneracyjnych. Dodatkowo PCA wykazał działanie hamujące agregacje nieprawidłowych białek jak np. alfa-synukleiny i beta-amyloidu w warunkach doświadczalnych, tym samym być może ma również dodatkowe działanie mogące wpływać na procesy neurodegeneracji.

Należy się zgodzić z Doktorantką, że PCA ma potencjał neuroprotektoryjny i może wspomagać procesy pamięci w postępujących procesach neurodegeneracji.

Dodatkowo opierając się na obserwacjach, że PCA wpływa na poziom BDNF w hipokampie i korze przedczołowej zwierząt oraz poprawia zdolności uczenia się i zapamiętywania w różnych modelach uszkodzenia mózgu, Doktorantka wysunęła hipotezę o możliwości wpływu przewlekłego podawania PCA na zdolności uczenia się i zapamiętywania u zdrowych zwierząt.

Podsumowując wszystkie podjęte przez Doktorantkę cele rozprawy doktorskiej są uzasadnione i nowe. Całkowicie nowy, jest podjęty przez Doktorantkę problem wpływu długotrwałego podawania PCA na uczenie się i zapamiętywanie u zdrowych zwierząt, jak również wpływ PCA na poziom wybranych neuroprzekaźników w ośrodkowym układzie nerwowym.

Cele pracy są poprawnie i jasno sformułowane. Doktorantka zbadała wpływ długotrwałego podawania PCA na procesy pamięciowe u szczurów w oparciu o testy behawioralne służące do oceny funkcji poznawczych oraz wykonała pomiary stężenia neuroprzekaźników w wybranych strukturach OUN zwierząt. Badanie zostało wykonane w dwóch etapach – u zwierząt zdrowych oraz w modelu eksperymentalnym upośledzenia funkcji poznawczych u szczura wywołanym podaniem D-galaktozy.

Strona merytoryczna rozprawy

We wstępie Doktorantka w sposób wyczerpujący omawia teorie pamięci, zaangażowanie poszczególnych struktur mózgu w funkcje zapamiętywania i uczenia oraz układy neuroprzekaźników biorących udział w tym procesie. Ponadto wstęp zawiera dokładny opis badanej substancji, kwasu protokatechowego wraz z przeglądem piśmiennictwa obejmującym doniesienia na temat jego działania w ośrodkowym układzie nerwowym, wpływie na układ krążenia, działaniem przeciwnowotworowym i działaniem cytotoksycznym. Należy podkreślić, że ta część rozprawy jest przygotowana w sposób bardzo szczegółowy oraz aktualny, biorąc pod uwagę ogromny rozwój wiedzy na temat organizacji funkcji poznawczych i wskazuje to na dużą wiedzę Doktorantki. Przedstawienie problemu badawczego oraz zastosowanych modeli doświadczalnych w pełni uzasadnia podjęty problem badawczy oraz zastosowaną metodykę badań.

Materiał i metody stosowane w pracy są prawidłowo i dokładnie opisane. Zarówno plan doświadczeń, jak i zastosowane metody behawioralne dla oraz metoda oznaczenia neurotransmiterów za pomocą HPLC jest prawidłowo dobrany i nie budzi zastrzeżeń.

Doktorantka przeprowadziła 2 doświadczenia, pierwsze obejmujące zdrowe zwierzęta karmione doustnie PCA w dwóch dawkach, 50 i 100mg/kg. Drugie doświadczenie jest identyczne co do planu wykonanych badań i oznaczeń, przeprowadzone jest w 4 grupach zwierząt: kontrolnej oraz otrzymujących doustnie D-galaktozę lub jednocześnie D-galaktozę i PCA w dwóch dawkach jw. W celu oceny pamięci Doktorantka stosuje test labiryntu wodnego (ocena uczenia się i pamięć przestrzenna) oraz test rozpoznawania nowego obiektu (uczenie się i pamięć wzrokowa). Dodatkowo Doktorantka stosuje test otwartego pola w celu zbadania nasilenia reakcji lękowej i reakcji na stres, co może być uzasadnione dla uniknięcia błędu przy wykonywaniu testów pamięci, pozwala również na ocenę czy podawane związki nie wpływają na lęk i zdolności eksploracyjne zwierząt. Doktorantka jednak nie podaje wprost powodu dla wybrania tego testu i wymaga to uzupełnienia.

Metodyka wykonania badań behawioralnych i oznaczenia poziomu neurotransmiterów jest opisana w sposób wyczerpujący i dokładny i pozwala ocenić zarówno sposób przeprowadzenia badania i wykonania oznaczeń jako prawidłowy. W części metodycznej ciekawe jest rozważanie różnic w funkcji i budowie mózgu gryzoni i innych zwierząt pozwalające tylko na przybliżone odniesienie zbadanych funkcji do człowieka, co jest oczywiste, zaś dopiero w dyskusji Doktorantka podaje uzasadnienia wybrania tych, a nie innych testów dla oceny pamięci – moim zdaniem powinno się to znaleźć właśnie w części metodycznej.

Wyniki są przedstawione w sposób jasny, uporządkowany i nie budzący wątpliwości. Zilustrowane są wieloma tabelami i wykresami pokazującymi wszystkie uzyskane dane. Pytanie jest, czy wobec wielości zmiennych nie spróbowano zbudować modelu statystycznego, który mógłby poszukać dodatkowych zależności, ponieważ choć widzimy czasami różnice nie uzyskują one poziomu istotności statystycznej przyjętej jako punkt odcięcia.

Dyskusja wyników i wnioski

Dyskusja jest podzielona na podrozdziały, które porządkują omawiane przez Doktorantkę wyniki.

Podstawowym przesłaniem pracy jest stwierdzenie, że PCA nie wpływa na procesy pamięci u zdrowych zwierząt, odwraca za to większość nieprawidłowości wywołanych poprzez D-Gal, zarówno na poziomie behawioralnym jak również na poziomie neurotransmiterów. Doktorantka po kolei analizuje poszczególne testy behawioralne a następnie poszczególne badane neurotransmitery w kontekście zastosowanego modelu upośledzenia pamięci jak również w kontekście zastosowania PCA

i omawia pozycje piśmiennictwa potwierdzające lub nie jej wyniki. Dodatkowo wskazuje na istniejące powiązania pomiędzy poziomem oznaczanych neurotransmiterów a wynikami uzyskiwanymi w testach pamięci, które potwierdzają się w obserwacjach płynących z obecnej pracy.

Sformułowane na końcu dyskusji wnioski odpowiadają postawionym hipotezom i celom badania i są w pełni uzasadnione.

Drobne pytania jakie nasuwają się podczas czytania dyskusji: 1. zaobserwowano, że pierwszego dnia zwierzęta z grup D-Gal+PCA50 oraz D-Gal+PCA100 wymagały więcej czasu na zlokalizowanie podwodnej platformy oraz pokonały w celu jej odnalezienia dłuższe dystanse niż zwierzęta z grupy D-Gal, a nie obserwowano takiej tendencji nigdy później. Czy czas od podania D-Gal do wykonywania testów behawioralnych danego dnia był taki sam w grupach D-Gal i D-Gal+PCA i taki sam w kolejnych dniach? Czy podanie D-Gal może wpływać na zachowanie zwierząt danego dnia (dodatkowo np. osłabiać funkcje pamięci?) Trudno tłumaczyć taki wynik stresem – test otwartego pola nie wykazał nasilonego stresu u zwierząt D-Gal+PCA.

2. Doktorantka w interesujący sposób omawia i dokumentuje spójność obserwowanych wyników testów behawioralnych z poziomem amin katecholowych w mózgach badanych zwierząt pokazując np., że D-Gal może upośledzać pamięć poprzez zmniejszanie poziomu serotoniny w korze przedczołowej i hipokampie, czy zmniejszać aktywność motoryczną zwierząt poprzez zmniejszenie poziomu dopaminy. Pokazuje również i dokładnie omawia korzystny wpływ podawania PCA odwracający wpływ D-Gal mający zarówno odzwierciedlenie w testach behawioralnych oraz w podniesieniu poziomu obniżonych przez D-Gal neurotransmiterów (serotonina i dopamina). Ponieważ większość zaobserwowanych zmian dotyczy struktur bezpośrednio zaangażowanych w pamięć jak kora przedczołowa i hipokamp, czy badano również poziom acetylocholino i jej enzymu znacznikowego AchE, których obniżony poziom wykazano po zastosowaniu D-Gal u zwierząt?

3. Bardzo ciekawe są rozważania nad rolą w MAO w procesie zarówno wywoływania przez D-Gal zaburzenia poziomu neurotransmiterów jak również odwracającego niekorzystny wpływ D-Gal - PCA. Oba związki mogą wpływać na aktywność MAO, a hamowanie MAO przez PCA wyjaśnia jego wpływ na obrót zarówno DA jak i 5-HT.

4. Doktorantka pokazuje również poziom aminokwasów w poszczególnych strukturach mózgu. Na uwagę zasługuje spadek glutaminianu, kwasy gamma-aminomasłowego, asparagianu i alaniny w hipokampie wskazując na uszkodzenie przez D-Gal tej struktury. Z innych publikacji wiadomo, że D-Gal może wywoływać apoptozę np. w korze słuchowej, zwiększać aktywność mikrogleju i astrocytów w hipokampie czyli nasilać odpowiedź zapalną, nasilać apoptozę w komórkach ziarnistych i piramidowych hipokampa oraz zmniejszać neurogenezę. Ponieważ D-Gal nie powoduje 'masywnego'

uszkodzenia hipokampa, czy spadek wielu neurotransmiterów nie wskazuje jednak na strukturalne uszkodzenie nie zaś tylko regulacyjne/czynnościowe zaburzenie?

Podsumowując, całość pracy Doktorantki oceniam bardzo wysoko. Zarówno temat podjętej pracy jak również wykonanie i prezentacja wyników są interesujące i przedstawione w sposób bardzo dobry. Należy się zgodzić, że wyniki przedstawione w niniejszej pracy stanowią uzupełnienie stanu wiedzy o wpływie PCA na procesy poznawcze i przekąźnictwo mózgowe u szczurów zdrowych i w D-galaktozowym modelu upośledzenia pamięci, istotne dla dalszego rozwoju samej cząsteczki PCA jak też w ogóle badań nad zaburzeniami pamięci. Mimo pytań, które nasuwają się po czytaniu dyskusji i uwag dotyczących metodyki pracy przedstawiona praca spełnia wszystkie wymagania stawiane pracy doktorskiej.

Mocne strony pracy

1. Wyniki pracy zostały w części opublikowane w postaci 2 publikacji oryginalnych: w recenzowanych czasopismach międzynarodowych. W publikacjach Doktorantka jest pierwszym autorem co świadczy o największym wkładzie w powstanie publikacji, a także w przeprowadzenie badań i analizę wyników.
2. Sam manuskrypt rozprawy jest świetnie przygotowany, napisany w sposób jasny i przejrzysty. Na uwagę zasługują świetne ryciny i tabele ilustrujące wyniki.
3. Na uwagę zasługuje fakt, sposób prowadzenia rozprawy w każdym miejscu krytyczny w stosunku do podejmowanego tematu badań, wyboru badanej substancji, stosowanej metodyki, wyboru zwierząt doświadczalnych, uzyskanych wyników itd. Świadczy to o bardzo merytorycznym podejściu do prowadzonych badań, przemyślanym postępowaniu badawczym, znajomości ich ograniczeń i dojrzałości Doktorantki.
4. Problem podjęty w pracy jest w dobry sposób uzasadniony. Choć wiele substancji zawartych w diecie było już przebadanych szczególnie jeśli miały własności antyoksydacyjne lub/i przeciwzapalne, nie można przyznać racji Doktorantce, że zbadanie mechanizmów działania PCA poza ewentualnym zbadaniem go jako kandydata na lek wpływający na postęp neurodegeneracji, poszerza wiedzę na temat mechanizmów uczenia się i pamięci w ogóle.

Konkluzja recenzji

Stwierdzam, że rozprawa doktorska magister farmacji Kingi Krzysztoforskiej pt: „Behawioralne i biochemiczne efekty działania kwasu protokatechowego na procesy pamięciowe u szczurów”, jest oryginalnym rozwiązaniem problemu naukowego oraz wykazuje ogólną wiedzę Doktorantki w uprawianej dyscyplinie naukowej (nauki medyczne) oraz umiejętności samodzielnego prowadzenia badań naukowych.

Jest również samodzielnym dorobkiem naukowym Doktorantki i spełnia warunki określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. nr 65, poz. 595 z późn.zm.) w związku z art. 179 ust. 1 ustawy z dnia 3 lipca 2018r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018r. poz. 1669 z późn.zm.).

Ze względu na wysoki poziom pracy wnioskuję o jej **wyróżnienie** oraz wnoszę do Rady Dyscypliny Nauk Medycznych WUM o dopuszczenie magister farmacji Kingi Krzysztoforskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.


KIEROWNIK
II Kliniki Neurologicznej
Iwona Kurkowska-Jastrzębska

prof. dr hab. n. med. Iwona Kurkowska-Jastrzębska

Warszawa 17 lutego 2022r.