

Akceptacja
[Signature]

Warszawa dn. 03.11.2024 r.

Prof. dr hab. med. Adam Stępień

Klinika Neurologii
Wojskowy Instytut Medyczny
Państwowy Instytut Badawczy
04 - 141 Warszawa, ul. Szaserów 128

OCENA

Rozprawy doktorskiej
Lekarz Justyny Komorowskiej

„Wpływ stężenia glukozy na właściwości przeciwzapalne resweratrolu w obrębie komórek śródbłonkowych i astrocytów - badania *in vitro* na modelu bariery krew-mózg”

na wniosek
Rady Dyscypliny Nauk Medycznych
Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska jest cyklem trzech prac oryginalnych opublikowanych w recenzowanych czasopismach naukowych o zasięgu światowym poświęconym badaniom nad neuroprotekcynym wpływem resweratrolu na ośrodkowy układ nerwowy, a w szczególności na właściwości przeciwzapalne resweratrolu w obrębie komórek śródbłonkowych i astrocytów. Badania doktorantka przeprowadziła in vitro na modelu bariery krew-mózg w Zakładzie Biofizyki, Fizjologii i Patofizjologii Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego. Promotorem rozprawy jest prof. dr hab. n. med. Dariusz Szukiewicza, a promotorem pomocniczym dr n. med. Mateusz Wątroba

Temat rozprawy jest niezwykle interesujący i wpisuje się w nurt badań nad chorobami układu nerwowego, w których element zapalny odgrywa istotną rolę patogenetyczną. Dzieje się tak w typowych chorobach neurodegeneracyjnych jak w chorobie Alzheimera czy chorobie Parkinsona zwłaszcza we wstępnym okresie rozwoju jak i szeregu innych. Stan zapalny odgrywa wiodącą rolę w patomechanizmie tych chorób i wiąże się z ich szybszą progresją. Jak przytacza doktorantka we wstępie do analizy swojego dorobku najnowsze badania wspierają hipotezę, iż jedną z opcji leczenia neuroprotekcynego może być stosowanie związków polifenolowych pochodzenia roślinnego, takich jak resweratrol, posiadających udokumentowane działanie przeciwzapalne oraz antyoksydacyjne. Jego przeciwzapalne i przeciwutleniające właściwości są związane ze zdolnością do aktywacji sirtuin, hamowania szlaku sygnalizacyjnego czynnika jądrowego kappa B (NF- κ B), jak również aktywacji autofagii. Stan zapalny rozwijający się w OUN w wyniku utrzymującego się podwyższonego poziomu glikemii może bezpośrednio uszkadzać neurony, co negatywnie wpływa na funkcjonowanie mózgu. Z tego powodu stale poszukuje się skutecznych metod ograniczenia odpowiedzi zapalnej w OUN. Resweratrol jest związkiem, który potencjalnie spełnia warunki niezbędne do zastosowania w terapii przeciwzapalnej w OUN. W celu zbadania tego problemu doktorantka zaplanowała i przeprowadziła badania własne opublikowane w czasopismach medycznych tj.

1. Komorowska J, Wątroba M, Szukiewicz D. Review of beneficial effects of resveratrol in neurodegenerative diseases such as Alzheimer's disease. *Adv Med Sci.* 2020 Sep;65(2):415-423. doi: 10.1016/j.advms.2020.08.002. Epub 2020 Aug 29. PMID: 32871321.
2. Komorowska J, Wątroba M, Bednarzak M, Grabowska AD, Szukiewicz D. The Role of Glucose Concentration and Resveratrol in Modulating Neuroinflammatory Cytokines: Insights from an *In Vitro* Blood-Brain Barrier Model. *Med Sci Monit.* 2023 Oct 11;29:e941044. doi: 10.12659/MSM.941044. PMID: 37817396; PMCID: PMC10578643.
3. Komorowska J, Wątroba M, Bednarzak M, Grabowska AD, Szukiewicz D. Anti-Inflammatory Action of Resveratrol in the Central Nervous System in Relation to Glucose Concentration-An *In Vitro* Study on a Blood-Brain Barrier Model. *Int J Mol Sci.* 2024 Mar 7;25(6):3110. doi: 10.3390/ijms25063110. PMID: 38542084; PMCID: PMC10970537.

Łączna punktacja prezentowanego cyklu publikacji: Impact Factor: 11.987, punkty MNiSW: 380.

We wstępie do zaprezentowania badań i ich wyników doktorantka uzasadnia wybór tematu swoich badań i przedstawia aktualny stan wiedzy na temat stanu zapalnego i jego roli w patomechanizmie nie tylko chorób zapalnych ale i zwyrodnieniowych w ośrodkowym układzie nerwowym oraz wpływu stężenia glukozy na indukcję stanu zapalnego. Podkreśla, że współcześnie istotnym problemem zdrowotnym jest wzrost częstości występowania chorób związanych z otyłością, w tym zaburzeń tolerancji glukozy tj. insulinooporności i cukrzycy typu 2. Komórki nerwowe preferencyjnie wykorzystują glukozę do uzyskania energii, a wahania poziomu glukozy mogą wpływać na procesy metaboliczne w OUN. W konsekwencji może to prowadzić do indukcji odpowiedzi zapalnej, zarówno w wyniku zwiększonej produkcji wolnych rodników tlenowych, jak i biosyntezy zaawansowanych produktów glikacji

Głównym celem badania była ocena wpływu stanów hipo-, normo- i hiperglikemii w przestrzeni 8 odpowiadającej naczyniom mikrokrążenia mózgowego na przepuszczalność bariery krew – mózg i działanie przeciwzapalne resweratrolu na poziomie mózgu. Dokonano oceny zmian poziomu glukozy na przenikanie przez barierę krew – mózg substancji o działaniu przeciwzapalnym takich jak resweratrol oraz analiza czy zmiany te modyfikują jego działanie w komórkach astrocytów.

Do przeprowadzenia eksperymentu doktorantka wykorzystwała model imitujący w warunkach *in vitro* stosunki panujące po obu stronach bariery krew – mózg, który składał się z dwóch głównych przestrzeni: mikrokrążenia, której powierzchnia styku z bariery krew – mózg pokryta była komórkami śródbłonna, oraz wewnątrzmożgowej, której powierzchnię styku tworzyły astrocyty. Model bariery krew – mózg zawierał kokultury komórek śródbłonna oraz astrocytów, które były rozdzielone półprzepuszczalną membraną z porami o średnicy 0,4 μm , uniemożliwiającą bezpośredni kontakt pomiędzy różnymi typami komórek.

Utworzono trzy grupy badane: grupa I imitująca warunki hipoglikemii, grupa II – normoglikemii, grupa III – hiperglikemii, przy stężeniach glukozy odpowiednio 40 mg% [2.2 mmol/L], 90 mg% [5.00 mmol/L] oraz 450 mg% [25mmol/L].

Po 24 h inkubacji komórek w warunkach określonego stężenia glukozy dokonano oznaczeń stężenia cytokin IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-17A, INF- γ , TNF- α oraz GM-CSF. Oszacowano również, czy samo stężenie glukozy w MC miało wpływ na różnice w poziomie cytokin prozapalnych w obrębie BC.

W celu wywołania reakcji zapalnej w sposób standardowy od strony wewnątrzmożgowej podawano lipopolisacharyd w stężeniu 0.2 μM , a po upływie kolejnych 24 h, do mikrokrążenia MC podawano resweratrol w stężeniu 50 μM .

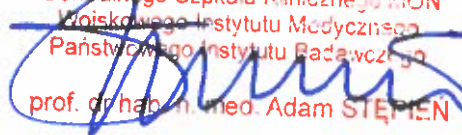
Doktorantka wykazała, że utrzymanie prawidłowej kontroli glikemii może być istotne dla efektywności działania substancji przeciwzapalnych, takich jak resweratrol. Może to stanowić podstawę do wprowadzenia modyfikacji dawkowania resweratrolu u osób z cukrzycą oraz po przebytych udarze czy zawale serca, w przypadku stanów hipo- i/lub hiperglikemii.

Publikacje zawarte w cyklu rozprawy doktorskiej stanowią spójną całość, dowodząc że współistniejący stan zapalny występujący w chorobach neurodegeneracyjnych, takich jak choroba Alzheimera, może zostać ograniczony dzięki zastosowaniu resweratrolu.

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska spełnia wymogi stawiane rozprawom na stopień doktora nauk medycznych. Opracowany temat badawczy dotyczy mało zbadanych i poznanych zagadnień bólu neuropatycznego w Polsce. Umiejętnie wyciągnięte wnioski z zaplanowanych i przeprowadzonych badań własnych wskazują, że doktorantka prawidłowo posługuje się warsztatem naukowym.

Przedstawiona mi do recenzji dysertacja doktorska lekarz Justyny Komorowskiej spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 roku Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. 2018 poz. 1668) (oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, wykazanie ogólnej wiedzy teoretycznej kandydata w dyscyplinie oraz umiejętności samodzielnego prowadzenia pracy naukowej).

Podsumowując pozytywnie oceniam rozprawę doktorską lekarz Justyny Komorowskiej i przedstawiam do dalszych postępowań przed Radą Dyscypliny Nauk Medycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego.

Kierownik Kliniki Neurologicznej
Centralnego Szpitala Klinicznego MION
Wojskowego Instytutu Medycznego
Państwowego Instytutu Badawczego

prof. dr hab. n. med. Adam STĘPIEN