



UNIwersytet  
PEDAGOGICZNY  
IM. KOMISJI EDUKACJI  
NARODOWEJ W KRAKOWIE

INSTYTUT BIOLOGII  
i NAUK o ZIEMI

ul. Podchorążych 2, 30-084 Kraków;  
tel.: 012 662-78-20, fax: 012 662-78-22, e-mail: [ibiol@up.krakow.pl](mailto:ibiol@up.krakow.pl)

Dr hab. Agnieszka Greń, prof. UP  
Katedra Fizjologii Zwierząt  
Instytut Biologii i Nauk o Ziemi  
Uniwersytet Pedagogiczny  
im. Komisji Edukacji Narodowej w Krakowie  
e-mail: [agnieszka.gren@up.krakow.pl](mailto:agnieszka.gren@up.krakow.pl)

Kraków, 2023.07.24

### RECENZJA

rozprawy doktorskiej Pani mgr Eweliny Kurowskiej-Rucińskiej pt.:  
**„Wpływ fumaranu dimetylu na pamięć przestrzenną oraz neurogenezę w szczurzym modelu choroby Alzheimera”** wykonanej w Katedrze Fizjologii Zwierząt i Człowieka, na Wydziale Biologii Uniwersytetu Gdańskiego, pod opieką naukową dr hab. Jolanty Orzeł-Gryglewskiej, prof. UG, i promotora pomocniczego dr Ireny Majkutewicz.

#### *Podstawa formalno-prawna*

Ocenę Pracy doktorskiej Pani mgr Eweliny Kurowskiej-Rucińskiej wykonałam w oparciu o pismo skierowane przez Przewodniczącą Rady Dyscypliny Nauki biologiczne Uniwersytetu Gdańskiego Panią dr hab. Joannę N. Izdebską, prof. UG, z dnia 13.06.2023, w którym, w imieniu Rady Dyscypliny Nauki biologiczne, zwraca się do mnie z prośbą o opracowanie recenzji w/w Rozprawy.

#### *Ogólna charakterystyka Rozprawy i ocena merytoryczna*

Badania prezentowane w ocenianej rozprawie doktorskiej dotyczą wpływu fumaranu dimetylu na pamięć przestrzenną oraz neurogenezę w szczurzym modelu choroby Alzheimera.

Choroba Alzheimera (*Alzheimer's disease* – AD) jest najczęściej występującym schorzeniem neurodegeneracyjnym wieku podeszłego. Jest chorobą o złożonej etiologii oraz patogenezie. Podstawowymi zmianami histopatologicznymi obserwowanymi w AD są zewnątrzkomórkowe blaszki starcze składające się z  $\beta$ -amyloidu ( $A\beta$ ) oraz wewnątrzkomórkowe sploty neurofibrylarne (*neurofibrillary tangles* – NFT), których liczba



często koreluje ze stopniem zaawansowania otępienia. Wraz z postępowaniem choroby pojawiają się m.in. deficyty funkcji poznawczych, zwłaszcza pamięci oraz zaburzenia zachowania, takie jak apatia i objawy psychotyczne. Z uwagi na proces starzenia się społeczeństw, częstość występowania zespołów otępiennych stale wzrasta. W związku z powyższym, problem odpowiedniej diagnostyki i terapii schorzeń wieku starczego nabiera ogromnej wagi. Stąd podjęty przez Panią mgr Ewelinę Kurowską-Rucińską temat rozprawy doktorskiej jest bardzo ważny ze względów poznawczych jak i praktycznych.

Oceniana rozprawa doktorska została przygotowana w postaci klasycznej monografii naukowej, napisana poprawnie w języku polskim. Rozprawa liczy 178 stron, jest podzielona na następujące rozdziały: Spis tabel str. 5-6, Spis rycin str. 7, Wykaz skrótów str. 8-10, Streszczenie str. 11-12, Abstract str. 13-14, Wstęp (w tym Założenia, hipotezy badawcze i cel pracy) str. 15-57, Materiały i metody str. 58-69, Wyniki str. 70- 126, Omówienie wyników i Dyskusja str. 127-152, Podsumowanie i Wnioski str. 153, Piśmiennictwo str. 154-170, Suplement str. 171-178.

Wstęp obejmuje 6 podrozdziałów, które teoretycznie – w oparciu o studium literatury - wprowadzają Czytelnika w zagadnienia związane z podjętą tematyką badawczą. Czytelnik zapoznaje się z charakterystyką choroby Alzheimera (AD) jako najpowszechniej występującym rodzajem otępienia. Autorka podaje dane statystyczne dotyczące zapadalności na tę chorobę neurodegeneracyjną, zwracając uwagę na jej wpływ na zaburzenia funkcji poznawczych, przede wszystkim pamięci, mowy, uwagi, rozwiązywania problemów i innych umiejętności, które warunkują wykonywanie podstawowych, codziennych czynności; wyszczególnia - zgodnie z Międzynarodową Statystyczną Klasyfikacją Chorób i Problemów Zdrowotnych - objawy pozwalające na diagnozę AD; wprowadza podział postaci AD na rodzinną (fAD) – 5-10% przypadków oraz sporadyczną (sAD) – 95% przypadków. Doktorantka podkreśla, że wystąpienie sAD jest efektem przede wszystkim wpływu czynników środowiskowych, np. chorób sercowo-naczyniowych, otyłości, cukrzycy, jak również stwierdza, że nie istnieje rodzinna historia sAD, a obecność genetycznych czynników ryzyka (m.in. allelu apolipoproteiny E  $\epsilon$ 4, związanego ze zwiększonym ryzykiem rozwoju miażdżycy) nie warunkuje rozwoju choroby. Opisuje związek choroby Alzheimera z sygnalizacją insulinową, stresem oksydacyjnym oraz stanem zapalnym

Autorka w podrozdziale 1.2. bardzo ciekawie opisuje nieodzowne dla poznania, analizy rozwoju i terapii AD zwierzęce modele choroby, w szczególności jej sporadycznej postaci, generowanej iniekcją streptozotocyny (STZ) do komór bocznych mózgowia. Model ten wykazuje duży stopień podobieństwa do objawów występujących u pacjentów z AD i obejmuje trzy poziomy: biochemiczny, morfologiczny i behawioralny. Doktorantka podaje dawki STZ stosowane w celu indukcji cukrzycy typu 1 lub typu 2, natomiast należy pamiętać iż nie tylko dawka ale również liczba iniekcji jest w tym aspekcie istotna, na co zresztą Autorka zwróciła uwagę przy opisie indukcji sAD.

Kolejno mgr Ewelina Kurowska-Rucińska charakteryzuje pamięć przestrzenną oraz bardzo dokładnie i obrazowo labirynty wykorzystywane do jej testowania/oceny (np. labirynt Bornesa, labirynt wodny Morrisa, labirynt ośmioramienny promienisty). Tę część dysertacji wzbogacają dwie tabele: Tab. 1. (str. 31), w której Autorka charakteryzuje systemy pamięciowe, które mogą być odzwierciedlone w modelach zwierzęcych oraz Tab. 2. (str. 33), w której Autorka przedstawia zalety testu labiryntu wodnego Morrisa w aspekcie wybranych cech charakterystycznych dla poznawczych testów behawioralnych. Szkoda, że Doktorantka w tym miejscu nie poparła poszczególnych przykładów pozycjami literatury, w których wykorzystano/badano ww. systemy pamięciowe. W tej części dysertacji wykazała, że deficyty



związane z pamięcią przestrzenną, w tym nawigacja przestrzenna oraz orientacja, są bardziej specyficzne dla wczesnego etapu AD i pozwalają na odróżnienie tej choroby od innych rodzajów otępienia – jest to związane m.in. z obecnością hiperfosforylowanych form białka tau. A więc ocena deficytów nawigacji i pamięci przestrzennej może stać się narzędziem diagnostycznym rozpoznania wczesnego stadium choroby Alzheimera. Ponadto, wykorzystanie testów oceniających pamięć przestrzenną u ludzi np. analogu labiryntu wodnego Morrisa może przyczynić się do zwiększenia translacyjności wyników badań na modelach zwierzęcych mających na celu opracowanie nowych strategii terapeutycznych.

Następnie Doktorantka przechodzi do charakterystyki neurogenezy w mózgowiu dorosłych osobników. Bardzo obrazowo i pięknie prowadzi Czytelnika przez historię odkrycia neurogenezy postnatalnej, przedstawia jej etapy, opisuje nisze neurogenne i ich elementy takie jak: mikroglej, astrocyty, komórki śródbłonka, naczynia krwionośne, komórki wyściółki, a także opisuje wybrane czynniki egzogenne regulujące proces neurogenezy. To, że w wielu miejscach wywodu mgr Ewelina Kurowska-Rucińska przytacza wyniki badań wielu naukowców, często się wykluczające, wskazuje na ważność podjętej przez nią tematyki rozprawy doktorskiej, zarówno w zakresie teoretycznym jak i praktycznym. W podsumowaniu tej części rozprawy Autorka stwierdza, że neurogeneza postnatalna nie powinna być określana wyłącznie jako proces statyczny, kompensacyjny lecz stanowi mechanizm plastyczności mózgu, a OUN dojrzałych osobników może dostosować produkcję nowych komórek nerwowych w odpowiedzi na zmiany środowiska.

W kolejnym podrozdziale Wstępu Doktorantka charakteryzuje potencjał terapeutyczny fumaranu dimetylu (DMF), leku stosowanego u dorosłych pacjentów w leczeniu rzutowo-remisyjnej postaci stwardnienia rozsianego, w kontekście choroby Alzheimera. Dane umieszczone w Tab. 3. (str. 52) stanowią czytelne podsumowanie głównych mechanizmów działania DMF i/lub jego metabolitu (MMF), głównie na stres oksydacyjny, procesy zapalne jak i funkcje mikrogleju. Reasumując uważam, że rozdział „Wstęp” został bardzo dobrze przygotowany.

Po zwięzłym i opartym na analizie wybranej literatury tematu Wstępie Autorka przechodzi do sformułowania nadrzędnego celu pracy czyli oceny skuteczności fumaranu dimetylu w łagodzeniu zaburzeń pamięci przestrzennej i neurogenezy w szurzym modelu spontanicznej choroby Alzheimera wywołanym iniekcją streptozotocyny do komór bocznych mózgu. W dalszej kolejności formułuje kolejny cel pracy, którym była weryfikacja hipotezy o skuteczności DMF w łagodzeniu dysfunkcji pamięci przestrzennej i zaburzeń neurogenezy wywołanych iniekcją STZ oraz hipotezy o zróżnicowanym stopniu nasilenia zmian wywołanych działaniem zarówno STZ, jak i DMF u zwierząt w różnym wieku. Mam wątpliwość czy istniała konieczność wprowadzania celu nadrzędnego, do którego, w dalszej części tego rozdziału dysertacji, Doktorantka odnosi się jako do hipotezy badawczej. Ponadto według recenzenta bardziej czytelne byłoby przedstawienie założeń pracy, hipotez badawczych oraz celu pracy np. w postaci punktów. Natomiast pozytywnie oceniam optymistyczne zakończenie tej części dysertacji, w której Doktorantka stwierdza, że wykazanie skuteczności DMF w łagodzeniu objawów AD na poziomie behawioralnym i neuronalnym w modelu zwierzęcym, opisane w niniejszej pracy, może otworzyć drogę do dalszych badań, zmierzających do wprowadzenia badanego związku jako nowego leku wspomagającego terapię choroby Alzheimera u ludzi. Z drugiej strony, opierając się na wcześniejszym ustaleniu Autorki, że statystyki pokazują, iż ponad 90% testowanych substancji, wykazujących potencjał terapeutyczny w odniesieniu do objawów choroby



Alzheimerera w modelu zwierzęcym nie przechodzi badań klinicznych lub w ogóle nie zostaje do nich dopuszczone, życzę po prostu osiągnięcia celu badań.

Wprowadzenie we Wstępie podrozdziałów sprawiło, że dysertacja jest uporządkowana i ma przejrzystą, łatwą do analizy treść. Na podkreślenie zasługuje bardzo czytelne opracowanie Wykazu skrótów używanych w tekście z poprawnymi tłumaczeniami polskimi, co znacznie ułatwia czytanie rozprawy doktorskiej.

Po przeczytaniu tej części dysertacji proszę aby Doktorantka wyjaśniła zdanie (str. 19) „Wzrost poziomu reaktywnych form tlenu (...) w mózgowiu może odbywać się na kilka sposobów, m.in. (...) zdolności A $\beta$  do produkcji ROS?

Z kolei na str. 49 doktorantka pisze: DMF...”wnikając do komórek szybko reaguje ze specyficznymi białkami wewnątrzkomórkowymi posiadającymi grupy tiolowe, np. GSH” – Moje pytanie: *Czy w związku z tym oznaczenie stężenia glutationu zredukowanego mogłoby być markerem oceniającym wpływ DMF na układ antyoksydacyjny w mózgowiu?*

W części metodycznej dysertacji Doktorantka przedstawia zwierzęta doświadczalne tj. 56 samców szczurów stada niespokrewnionego Wistar, które w wieku 3 miesięcy i początkowej średniej masie ciała  $250\pm 50$  g zostały przywiezione do Zwierzętarni Katedry Fizjologii Zwierząt i Człowieka Wydziału Biologii Uniwersytetu Gdańskiego, gdzie były utrzymywane w warunkach LD 12:12, 50-60% wilgotności, przy średniej temperaturze 20-22°C, z pełnym dostępem do wody i pożywienia. Po dwutygodniowym okresie adaptacji do nowych warunków, a także do osoby eksperymentatora, zwierzęta podzielono na dwie grupy wiekowe: „młodych zwierząt” i „starych zwierząt”, dalej każdą podzielono na 4 grupy doświadczalne. Następnie, u zwierząt 4 grup doświadczalnych w obrębie tzw. „zwierząt młodych” wdrożono dalsze procedury doświadczalne. Natomiast szczury podzielone na 4 grupy, w obrębie tzw. „starych zwierząt” hodowano do osiągnięcia wieku 22 miesięcy, a po 7 dniach *handlingu* również wdrożono procedury doświadczalne. Procedur te obejmowały: 1. Sesję treningową w labiryncie wodnym Morrisa; 2. Test nabywania pamięci przestrzennej; 3. Próbę z usuniętą platformą tzw. *probe* test (będący właściwą miarą pamięci referencyjnej); 4. Test pamięci roboczej krótkotrwałej. Dużym ułatwieniem w zrozumieniu podziału na grupy doświadczalne i czasu wprowadzanych procedur doświadczalnych jest umieszczenie na str. 59 czytelnego schematu (Ryc.1). Podczas każdej próby, łącznie w ciągu 7 dni testu (z wyjątkiem sesji treningowej) rejestrowano takie parametry jak: latencja dotarcia do platformy (lub pierwszego dotarcia do wirtualnego konturu platformy w przypadku *probe* testu), pokonany dystans, % czasu spędzonego w kwadrancie docelowym. Dodatkowo wykorzystując odpowiednie oprogramowanie pozyskiwano mapy ciepła, dzięki którym przeanalizowano tor ruchu zwierząt oraz miejsca, w których przebywały częściej i dłużej. Na przeprowadzenie doświadczeń uzyskano zgodę Lokalnej Komisji Etycznej ds. Doświadczeń na Zwierzętach.

Dwudziestego piątego dnia procedury doświadczalnej, godzinę po zakończeniu ostatniej próby sesji 7, dokonano eutanazji zwierząt, pobrano mózgowia, które po odpowiednim przygotowaniu poddawano procedurom immunohistochemicznym.

Na wyróżnienie zasługuje bardzo szczegółowy opis stosowanych procedur, które bez problemu powtórzyłyby każdy zainteresowany tym tematem badacz.

W ostatnim podrozdziale znajduje się dokładny opis analizy statystycznej uzyskanych wyników.

Analizując ten rozdział rozprawy doktorskiej nasunęły mi się następujące pytania:

*Czy Doktorantka sama pobierała tkanki i jaka była waga każdego, pobranego mózgowia?  
Czy Autorka obserwowała jakieś objawy fizyczne, behawioralne stresu?*



Jeszcze raz pragnę podkreślić, że stosowane metody/procedury badań są bardzo dokładnie opisane co sugeruje praktyczne zaangażowanie Autorki w wykonywanie żmudnych, długotrwałych i wymagających doświadczenia metod badawczych. Wszystkie zastosowane metody są różnorodne, nowoczesne i z powodzeniem stosowane w różnych jednostkach naukowych.

Kolejny rozdział dysertacji – „Wyniki”, podzielony na 4 podrozdziały, jest bardzo szczegółowy, logiczny, klarowny, wskazujący na ogrom pracy, którą wykonała Doktorantka. Wzbogacony jest licznymi, czytelnymi rycinami (17) oraz 28 tabelami, z dodatkowymi podpunktami.

W rozdziale „Omówienie wyników i dyskusja”, Autorka z powodzeniem omawia oraz interpretuje uzyskane wyniki badań własnych i zestawia je z wynikami badań innych autorów. Stwierdza, że uzyskane wyniki wskazują, że STZ-ICV spowodowała silne zaburzenia pamięci referencyjnej oraz pamięci roboczej, szczury tej grupy doświadczalnej wykazywały najsilniej upośledzoną dynamikę procesów pamięciowych, a także silne zaburzenia generowania nowych komórek w hipokampie i opuszce węchowej. Zgodnie z oczekiwaniami, analiza uzyskanych wyników przeprowadzonych badań wykazała, że terapia fumaranem dimetylu statystycznie istotnie złagodziła efekty ośrodkowego podania STZ, nastąpiło skrócenie latencji i dystansu (z wyjątkiem sesji 1. i 2.) podczas nabywania pamięci referencyjnej, wydłużenie czasu spędzonego w kwadracie docelowym w labiryncie wodnym Morrisa, osiągając wyniki zbliżone do szczurów grupy kontrolnej. Uzyskane przez Doktorantkę wyniki sugerują również, że związek ten ma zdolność do ograniczenia zaburzeń neurogenezy, a korzystny wpływ terapii DMF na przeżywalność niedojrzałych neuronów ( $DCX^+$ ) stwierdzono zarówno w hipokampie jak i opuszce węchowej szczurów i co warto podkreślić, niezależnie od ich wieku. Ponadto uzyskane wyniki, u większości grup badawczych, potwierdzają istotny wpływ wieku szczurów na badane parametry. Autorka stwierdziła, że zmiany związane ze starzeniem się w kontekście powstania nowych komórek nerwowych i przeżywalności niedojrzałych neuronów były silniej zaznaczone w opuszce węchowej szczurów.

Autorka jednoznacznie potwierdza trafność teoretyczną oraz podobieństwo efektów zwierzęcego modelu sAD do objawów występujących u pacjentów z sAD. Model ten umożliwia również wgląd w czasowy przebieg różnych procesów patologicznych. To osiągnięcie Doktorantki zapewnia większą wartość translacyjną dla badań nad etiologią spontanicznej choroby Alzheimera oraz poszukiwania nowych rozwiązań terapeutycznych (może właśnie związanych z podaniem DMF), szczególnie w porównaniu z modelami transgenicznymi. W tej części dysertacji, ciekawym rozwiązaniem jest przedstawienie w formie Tab. 22. (str. 143-145) przeglądu wybranych danych literaturowych dotyczących wpływu iniekcji STZ do komór bocznych mózgowia na procesy postnatalnej neurogenezy.

Równocześnie – jak sama Autorka podkreśla – wyniki przeprowadzonych badań stanowią inspirację do ich kontynuacji, tj. rozpoczęcia badań przedklinicznych oraz prób klinicznych z udziałem pacjentów, u których zdiagnozowano chorobę Alzheimera.

Lektura tej części dysertacji dowodzi erudycji Doktorantki i znajomości przedmiotu badań, wskazuje na jej dojrzałość i wnikliwość naukową.

W końcowej części dysertacji Doktorantka formułuje trzy wnioski będące równocześnie syntetycznym podsumowaniem efektów prowadzonych eksperymentów naukowych.



W rozdziale „Piśmiennictwo” Autorka cytuje 258 anglojęzycznych pozycji literatury. Ponad 50% z tych artykułów naukowych zostało opublikowane po roku 2011. Cytowane są również publikacje z 2022 (10), a nawet jedna z 2023 roku, przedstawiają więc najnowszy i najbardziej aktualny stan wiedzy na zawarty w rozprawie doktorskiej temat. Jest to dowód na to, że Autorka na bieżąco śledziła publikacje dotyczące badanego tematu, ale także nie neguje podstaw badań naukowych cytując publikację z 1948 roku. Cytowana literatura jest ściśle związana z tematem ocenianej pracy doktorskiej.

Rozprawę zamyka „Suplement” zawierający szczegółowe wyniki pomiarów wraz z podstawowymi statystykami opisowymi i wartościami istotności statystycznej p.

Podsumowując uważam, że podjęte przez Panią mgr Ewelinę Kurowską-Rucińską badania naukowe zostały bardzo dobrze przemyślane i zaplanowane, aby osiągnąć zamierzony cel. Ponadto, chcę podkreślić, że w przeważającej części pracy Doktorantka posługuje się bardzo ładnym, jednoznacznie zrozumiałym językiem polskim. Ma umiejętność jasnego, syntetycznego, precyzyjnego, zrozumiałego dla Czytelnika formułowania myśli, wykazując się dojrzałością naukową.

#### *Podsumowanie i wniosek końcowy*

Stwierdzam, że rozprawa doktorska Pani mgr Eweliny Kurowskiej-Rucińskiej powstała na podstawie bardzo dużego wkładu Jej pracy w przeprowadzenie badań naukowych i Jej niezwyklej pracowitości. Projekt rozprawy doktorskiej został dobrze zaplanowany, a właściwy dobór metod badawczych pozwolił na bardzo dobrą realizację założeń rozprawy. Świadczy też o bardzo dobrym przygotowaniu Doktorantki do prowadzenia badań naukowych na wysokim poziomie. Rozprawa jest znaczącym osiągnięciem Doktorantki, ale również Jej opiekunek naukowych.

Konkludując, jednoznacznie twierdzę, że prowadzone badania stanowią rozwiązanie oryginalnego problemu naukowego założonego w celu badań, a przedłożona mi do oceny dysertacja pt. „Wpływ fumaranu dimetylu na pamięć przestrzenną oraz neurogenezę w szczurzym modelu choroby Alzheimera” jest nowatorska i wartościowa i spełnia wszystkie wymogi określone w artykule 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. 2003, nr 65, poz. 595 z późn. zm.), w zw. z art. 179. Ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. 2018 poz.1669 z późn. zm.). W związku z powyższym przekładam Radzie Dyscypliny Nauki biologiczne Uniwersytetu Gdańskiego wniosek o przyjęcie rozprawy doktorskiej i dopuszczenie Pani mgr Eweliny Kurowskiej-Rucińskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

  
DYREKTOR  
Instytutu Biologii i Nauk o Ziemi

dr hab. Agnieszka Greń, prof. UP