

Prof. dr hab. n. med. Joanna Lewin-Kowalik

Katowice 16.08.2023

Katedra i Zakład Fizjologii

Śląskiego Uniwersytetu Medycznego

w Katowicach

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Eweliny Kurowskiej–Rucińskiej „Wpływ fura-
ranu dimetylu na pamięć przestrzenną oraz neurogenezę w szczurzym modelu
choroby Alzheimera”**

Ośrodkowy układ nerwowy dorosłych ssaków, w tym człowieka, praktycznie nie ma możliwości spontanicznej, efektywnej funkcjonalnie samonaprawy po uszkodzeniu. Przez długi czas dominującym poglądem był pogląd Santiago Ramon y Cajala, że u dorosłych osobników w OUN nie powstają nowe neurony. Na szczęście postęp w neurobiologii obalił tę doktrynę, gdyż obecnie wiadomo ponad wszelką wątpliwość, że po urodzeniu przez całe życie osobnicze w różnych okolicach UON zachodzą procesy neurogenety, a nowopowstałe neurony migrują wzdłuż dość dobrze zdefiniowanych u zwierząt szlaków do określonych celów. Obecnie wiadomo również, że podobne zjawiska związane z neurogenezą zachodzą także w mózgu człowieka, choć dowody na to były z oczywistych powodów trudne do uzyskania. Nihilizm terapeutyczny ciągle w znacznym stopniu obecny w przypadku urazów OUN oraz chorób neurodegeneracyjnych niezwykle podgrzał oczekiwania związane z faktem, że w OUN dochodzi do powstawania nowych neuronów. Konieczność opracowania skutecznych metod terapeutycznych schorzeń OUN jest także niewątpliwie związana z wydłużaniem życia ludzi i starzeniem się populacji światowej, zwłaszcza w krajach wysokorozwiniętych, co skutkuje masowymi problemami

zdrowotnymi w tym rosnącą populacją osób w podeszłym wieku z zaburzeniami kognitywnymi o różnym nasileniu, które na ogół w końcu prowadzą do otępienia. Najczęściej diagnozowanym rodzajem otępienia jest choroba Alzheimerera dotykająca wiele milionów osób na świecie. W obrazie klinicznym, zwłaszcza na początku manifestowania się choroby, dominują zaburzenia kognitywne, a w obrazie histopatologicznym utrata neuronów cholinergicznym przodomózgowia (jako patognomoniczne w jądrze Meinerta) postępująca następnie na inne okolice oraz występowanie złogów β amyloidu i splątań neurofibrilarnych w aksonach. Mimo że nie zostało zdefiniowane czy te patologie białkowe są skutkiem czy przyczyną neurodegeneracji w AD przez długi czas główna aktywność badawcza związana z poszukiwaniem skutecznego przyczynowego leczenia była zogniskowana właśnie na nich. Mimo ogromnych kosztów i wielkiej liczby zaangażowanych zespołów badawczych z najlepszych ośrodków naukowych na świecie terapie dotyczące tych patologii nie okazały się zadowalająco skuteczne. Ponieważ wspomniana uprzednio postnatalna neurogeneza obserwowana jest w strukturach zaangażowanych w wytwarzanie nowych śladów pamięciowych, a amnezja następcza to główny objaw kognitywny AD, logicznym jest zogniskowanie działań badawczych związanych z patofizjologią choroby Alzheimerera na neurogenezie i poszukiwanie ewentualnych sposobów korzystnego wpływu na ten proces. W ten właśnie nurt rozumowania badawczego wpisuje się niniejsza rozprawa doktorska Pani Magister Eweliny Kurowskiej – Rucińskiej „Wpływ fumanaru dimetylu na pamięć przestrzenną oraz neurogenezę w szczurzym modelu choroby Alzheimerera”. Jest to obszerne, ponad stu siedemdziesiąt stronice opracowanie zawierające opis dobrze zaplanowanych badań wykonanych w zespole badawczym posiadającym doświadczenie i osiągnięcia w tej materii.

Praca skonstruowana jest w sposób typowy dla tego rodzaju opracowań

i składa się z następujących części: streszczenie w języku polskim i angielskim, wstęp kończący się przedstawieniem założeń i celu pracy, materiały i metody, wyniki, dyskusja i wnioski. Poza tym zamieszczono również spis tabel, spis rycin, wykaz skrótów oraz suplement zawierający „surowe” wyniki badań. Bibliografia to 258 pozycji w większości pochodzące z ostatnich 15 lat, choć znajdują się w niej również prace znacznie starsze jak choćby powszechnie uznana praca Barnes'a z 1988.

Wstęp jest obszernym 40 stronicowym rozdziałem, który Autorka rozpoczyna w pierwszym podrozdziale od krótkiej charakterystyki AD, a następnie omawia związek zaburzeń sygnalizacji insulinowej oraz stresu oksydacyjnego i ośrodkowego stanu zapalnego z patomechanizmami sporadycznej formy AD. Ten podrozdział dobrze ukazuje złożoność mechanizmów, które mogą prowadzić do rozwinięcia procesu chorobowego w OUN klinicznie diagnozowanego jako sporadyczna forma choroby Alzheimera. W następnym podrozdziale skupia się na przekonaniu czytelnika, że wybór modelu zwierzęcego sAD z zastosowaniem dokomorowej iniekcji streptozotocyny jest wyborem racjonalnym, który pozwoli odnieść uzyskane w eksperymencie wyniki do patologii ludzkiej. W tekście tym znalazły się jednak sformułowania, z którymi nie mogę się zgodzić. W wierszu 14 na stronie 23 jest napisane: "Większość regionów mózgu, które są unerwione przez neurony cholinergiczne" co jest moim zdaniem niezręczne, bo mówiąc o unerwieniu myślimy o narządach docelowych (mięśnie, gruczoły), natomiast w odniesieniu do skupisk neuronów ośrodkowych na ogół określa się to jako projekcje do innych okolic OUN. Fakt, że NGF nie jest syntetyzowany przez neurony, na które działa, lecz jest produkowany przez struktury około neuronalne, a następnie wstecznym transportem aksonalnym przenoszony wzdłuż aksonów został opisany już przez Ritę Levi – Montalcini (sławny eksperyment na zarodkach kurzych) jest tak oczywisty, że nie powinien moim zdaniem być uwzględniany w opracowaniu tej rangi. Wracając do głównego toru

rozumowania dotyczącego modelu STZ-ICV Autorka w sposób przekonujący uzasadnia, że STZ podana dokomorowo wywołuje w OUN stres oksydacyjny i ośrodkowy stan zapalny obserwowane również w mózgowiu osób narażonych na czynniki chorobowe i środowiskowe inicjujące sporadyczną formę choroby Alzheimera. Pod koniec tej części zaznacza, że model zwierzęcy choroby Alzheimera STZ-ICV wymaga dalszych badań, co jest szczególnie istotne dla kreowania ewentualnych strategii terapeutycznych. Jak wiemy żaden z modeli zwierzęcych chorób neurodegeneracyjnych nie oddaje w 100% procesów zachodzących w OUN u człowieka, ale w badaniach tego typu badacze są poniekąd na nie skazani. Jeżeli tylko wykażą się krytycyzmem w przenoszeniu wyników swoich badań na działania kliniczne, to można mieć nadzieję, na dalszy satysfakcjonujący postęp również w terapii.

Kolejny podrozdział zajmuje się pamięcią przestrzenną, w tym sposobami jej oceny. Na szczególne podkreślenie zasługuje odniesienie się do zaburzeń tej pamięci w AD. Diagnozowanie deficytów poznawczych w celu postawienia diagnozy w demencji nie jest łatwe i często zaburzone przez wiele czynników. Powszechnie analizuje się pamięć następczą deklaratywną, czyli zdolność do tworzenia nowych śladów pamięciowych, a z danych przedstawionych przez Autorkę wynika, że to pamięć przestrzenna jest najczulszym parametrem, który powinien być badany.

Następny podrozdział dotyczy neurogenezy u dorosłych osobników różnych gatunków w tym naczelnych. Jest on napisany z dużą znajomością tematu i w sposób jasny wskazuje, że struktury, w których taki proces zachodzi są strukturami zaangażowanymi w procesy pamięciowe. Tutaj natknęłam się na stwierdzenie, że proliferacja NPC występuje w korze i nerwie wzrokowym, co do którego muszę stanowczo zaprotestować, ponieważ nerw wzrokowy jest wyłącznie skupiskiem aksonów komórek zwojowych siatkówki i to one są ciałami komórek, które ewentualnie mogą podlegać podziałom. Opisano

także budowę nisz neurogennych, rolę jaką pełnią w nich różne populacje komórkowe, wybrane czynniki wpływające na proces neurogenezy oraz jej zaburzenia w przebiegu AD. Szczególnie ważne jest podkreślenie, że neurogeneza w dojrzałym OUN to proces kompensacyjny, który może jednak podlegać wpływom środowiska.

Podrozdział 1.5 jest poświęcony fumaranowi dimetylu, którego terapeutyczne zastosowanie w chorobie Alzheimera jest głównym celem niniejszej rozprawy. Jest on napisany dobrze, z dużą znajomością tematu i uwypukleniem najistotniejszych faktów przemawiających za przyszłościowym rozważeniem użycia tego leku w terapii AD. Niewątpliwą zaletą tej substancji jest fakt, że jest już stosowana od dość dawna w leczeniu łuszczycy, a od 2013 włączona do leczenia stwardnienia rozsianego.

Założenia i cel pracy zostały przedstawione w ostatnim podrozdziale wstępu. Po krótkim podsumowaniu znajdujemy stwierdzenie, że : Nadrzędnym celem pracy była ocena skuteczności fumaranu dimetylu (DMF) w łagodzeniu zaburzeń pamięci przestrzennej i neurogenezy w szczurzym modelu sAD wywołanym STZ- -ICV. Dla weryfikacji tej hipotezy po podaniu lub nie, zwierzętom młodym lub starym DMF w wykonano zadania badawcze polegające na:

1. Porównaniu referencyjnej i roboczej pamięci przestrzennej przy pomocy testu labiryntu wodnego Morrisa
2. Zbadanie nasilenia neurogenezy w hipokampie i opuszce węchowej.

Rozdział drugi Materiał i metody liczy 11 stron. Badania przeprowadzono na łącznie 56 samcach szczurów szczepu Wistar, z których połowa (28) były to osobniki młode (3 miesiące), a druga połowa (28) stare (22 miesiące). Każda z nich została podzielona na 4 równoliczne grupy doświadczalne. Moje wątpliwości budzi mała liczba zwierząt w każdej grupie choć zakładam, że wynika ona z restrykcji nałożonych przez komisję

Etyczną. Poza tym mało prawdopodobne jest, że nie doszło do straty zwierząt poddawanych dość inwazyjnym procedurom jak choćby obustronna iniekcja dokomorowa. Plan badań w czasie został przedstawiony w formie prostego schematu. Wszystkie działania związane z podawaniem leku, podaniem streptozotocyny, podaniem znacznika i wykonaniem testów behawioralnych zostały opisane na ogół rzetelnie. Jeśli chodzi o iniekcję dokomorową, to chciałam zapytać, czy nie obserwowano płynotoku z otworu trepanacyjnego, ponieważ nie został on zamknięty np. woskiem chirurgicznym. Obróbka pobranych fragmentów tkankowych była przeprowadzona przy pomocy nowoczesnych powszechnie stosowanych metod immunohistochemicznych. Moje wątpliwości natomiast budzi sposób oceny preparatów poddanych znakowaniu immunochemicznym i analizowanych w mikroskopie fluorescencyjnym. Po pierwsze napisano, że wyznakowane komórki były liczone manualnie, co w obecnym czasie przy powszechnym dostępie do różnych programów automatycznego zliczania jest zaskakujące. Zakładając jednak, że z niezrozumiałych dla mnie powodów użycie tych nowoczesnych metod było niemożliwe, to przy liczeniu manualnym podaje się kwalifikacje osoby zliczającej, która poza tym musi być niezorientowana co do grupy, z której pochodzi materiał. Napisano, że z każdego fragmentu wykonywano dwa zdjęcia, a na każdym zdjęciu zaznaczano obszar o powierzchni $0,01 \text{ mm}^2$. Nie rozumiem o co tu chodzi. Bloczki były cięte na skrawki o grubości $20 \mu\text{m}$. Na jakiej zasadzie dokonywano wyboru skrawka, w którym zliczano komórki. Przecież chodzi o to aby w każdym przypadku dotyczyło to kompatybilnych okolic (głębokości w strukturze), inaczej całe liczenie nie ma sensu. Napisano cytując; „Określono w ten sposób liczbę nowopowstałych komórek-zawierających BrdU, liczbę niedojrzałych neuronów- zawierających DCX oraz procent komórek podwójnie znakowanych, z sumy wszystkich komórek wykazujących fluorescencję. Liczono komórki obu struktur, zarówno z półkuli lewej jak i prawej, a do dalszych analiz dla każdego szczura wykorzystywano wynik

uśredniony". Co więcej obróbce statystycznej poddano nie bezwzględne liczby wyznakowanych komórek (z opisu nie wynika gdzie zlokalizowanych), lecz odsetek (czyli wartość względną. A zatem jeżeli w jednym przypadku suma komórek wynosiła 100 a z BrdU było 40, w drugim suma komórek wynosiła 10000, a z BrdU było 4000 to w obu przypadkach było to 40%. Czyli tyle samo????). W uznaniu sposobu oceny preparatów za rzetelny nie pomagają zdjęcia zamieszczone w rozdziale Wyniki, których jakość jest bardzo słaba chyba przed wszystkim ze względu na bardzo małe zdjęcia skomponowane w zbiorczą rycinę. Zdaję sobie sprawę, że tego rodzaju składanki przygotowuje się często do publikacji, lecz w pracy monograficznej można było zaprezentować choćby wybrane przykłady przekonujących znakowań.

Rozdział 3 Wyniki liczy 53 strony i składa się z dwóch głównych części:

I - przedstawiającej wyniki badań w labiryncie wodnym Morrisa a składającej się z podrozdziałów 3.2, 3.2 i 3.3

II- przedstawiającej dane dotyczące neurogenezy 3.4

Rozdział ten zawiera 16 tabel oraz 19 rycin.

Analiza statystyczna wyników została przeprowadzona przy użyciu programu Statistica 12.

Wyniki przeprowadzonych badań zostały przedstawione bardzo szczegółowo, a zastosowane sposoby ich prezentacji mimo mnogości informacji ułatwiają czytelnikowi poruszanie się w tym oceanie danych. Pomocne w szybkiej orientacji czytelnika w zawartości rycin jest zachowanie określonych barw wskazujących poszczególne grupy. Ciekawym i cennym uzupełnieniem są obrazy pokazujące charakterystyczne zachowania zwierząt z różnych grup w teście labiryntu wodnego.

Tytuł ostatniego czwartego rozdziału to „Omówienie wyników i dyskusja” i rzeczywiście w pierwszym podrozdziale Autorka dokonuje zwięzłego podsumowania uzyskanych wyników rozpoczynając tradycyjnie od badań pamięci przestrzennej i wpływu DMF na jej funkcjonowanie u zwierząt młodych i starych w modelu STZ-IVC . Iniekcja streptozotocyny spowodowała zaburzenia pamięci RM (długotrwałej) i WM (krótkotrwałej). Z kolei terapia fumaranem dimetylu znacząco poprawiła funkcje kognitywne w tym modelu zwłaszcza u zwierząt młodych.

Odnosząc się do badań neurogenezy (zakładam, że analiza została wykonana prawidłowo, a zgłoszone wcześniej przeze mnie uwagi wynikają jedynie z problemów z właściwym jej opisaniem) Autorka stwierdziła zaburzenia neurogenezy w modelu STZ-ICV zarówno u zwierząt starych jak i młodych. Zastosowanie terapii DMF spowodowało w obu grupach zahamowanie negatywnych skutków streptozotocyny. Moim zdaniem bardzo istotnym, a nie podkreślanym przez Autorkę wynikiem jest korzystny wpływ terapii DMF w grupach Sham-DMF u zwierząt starych i młodych, czyli u osobników zdrowych w różnym wieku. Obserwacja ta może mieć największe potencjalne znaczenie praktyczne, bo można założyć, że u osobników obarczonych czynnikami ryzyka rozwoju choroby Alzheimera można by rozważać profilaktyczne zastosowanie DMF. Moim zdaniem w AD manifestującej się klinicznie mamy już do czynienia ze znaczącymi stratami neuronów trudnymi do zrekompensowania. Również krótki czas trwania eksperymentu (nawet jak na model szczurzy) jest ograniczeniem do szukania analogii klinicznych. Zachęcałabym badaczy do wydłużenia czasu obserwacji i ponownej oceny stabilności zarówno modelu zwierzęcego AD jak i odległych skutków terapii, lub też efektywności terapii długotrwałej. Na stronach 130-153 autorka dyskutuje swoje obserwacje z doniesieniami innych autorów. Rozdział ten świadczy do bardzo dobrej znajomości zagadnień związanych z wyko-

nymi badaniami i nie tylko z nimi. Pani mgr Ewelina Kurowska- Rucińska jest pracownikiem naukowym o bardzo rozległej wiedzy i imponuje również dobrą orientacją w sprawach stricte medycznych. Moim zdaniem czasami jednak zbyt szczegółowo i z dużą liczbą detali referuje prace, z którymi konfrontuje swoje osiągnięcia. Prowadzi to do niepotrzebnego „rozwodnienia” tej dyskusji. Powinna popracować nad umiejętnością syntetycznego wyrażania myśli. Ta uwaga odnosi się zresztą nie tylko do ostatniego rozdziału.

Pracę kończy przedstawione w punktach Podsumowanie i wnioski. Poprzedni rozdział Autorka rozpoczęła od podsumowania wyników, tak więc moim zdaniem na koniec powinna sformułować wnioski będące odpowiedzią na cele pracy. Tak się jednak nie dzieje. Punkt 1 odnosi się do skutków iniekcji streptozotocyny, co nie było celem pracy, a wybór modelu STZ-ICV został uzasadniony wielokrotnie. Pozostałe dwa punkty również nie są wnioskami lecz luźnymi dywagacjami na temat rozprawy.

Przypominam cele były dwa i oba dotyczyły wpływu terapeutycznego DMF na zachowanie pamięci długotrwałej i krótkotrwałej oraz neurogenezę w zwierzęcym modelu STZ-ICV choroby Alzheimerera. Ma nadzieję, że podczas przygotowania materiałów do publikacji czytelne wnioski zostaną sformułowane.

Pozwolę sobie na ogólna refleksję dotyczącą podejścia Autorów (Doktorantka jest wszak członkinią zespołu badawczego) do analizowanego problemu. Odnoszę wrażenie, że jest obawa precyzyjnego zdefiniowania przyczyn i skutków obserwowanych zmian. Procesy pamięciowe oraz zmiany w populacji neuronalnej są przedstawiane niejako równolegle, bez podkreślenia związku przyczynowo skutkowego między nimi. To przecież wahania w liczbie komórek, zwłaszcza w obrębie zakrętu zębatego w hipokampie, są powodem pogorszenia lub polepszenia procesów kognitywnych. I to powinno być moim zdaniem wyraźnie wyartykułowane.

Podsumowując pragnę stwierdzić że pomimo dość licznych uwag krytycznych zawartych w niniejszej recenzji mogę stwierdzić, że Autorka wykazała się umiejętnością przeprowadzenia badań nad złożonym i ciekawym problem badawczym, potrafiła zastosować do planowanych badań adekwatne techniki laboratoryjne, umiała właściwie posłużyć się narzędziami statystycznymi oraz wykazała się bardzo dobrą znajomością adekwatnego i nowoczesnego piśmiennictwa .

Stwierdzam zatem, że przedstawione mi do oceny rozprawa mgr Eweliny Kurowskiej-Rucińskiej „Wpływ fumaranu dimetylu na pamięć przestrzenną oraz neurogenezę w szczurzym modelu choroby Alzheimera” spełnia warunki określone w art.13 Ustawy z dnia 14marca 2003 r. o stopniach i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. nr65. poz. 595 z późn. Zm. w zw.z art. 179. Ustawy z dnia 3 lipca 2018 i zwracam się do Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie Pani mgr Eweliny Kurowskiej-Rucińskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Prof. dr hab. n. med.

Joanna Lewin-Kowalik

