



Łódź, 5 czerwca 2023

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Pawła Napory pt. Kompensacja komunikacji nerwowo-odpornościowej po zahamowaniu aktywności cyklooksygenaz

Charakterystyka i znaczenie podjętej problematyki badawczej

Wymiana informacji pomiędzy układem odpornościowym i nerwowym odgrywa kluczową rolę w utrzymaniu równowagi pomiędzy procesami pro- i przeciwzapalnymi. Komunikacja między tymi układami przebiega dwukierunkowo, przy czym ekspozycja na patogeny lub stany zapalne aktywuje sygnalizację neuronalną, a neuroprzekazniki monoaminergiczne i aminokwasowe wpływają na funkcje komórek odpornościowych. W kontekście komunikacji między układem nerwowym i odpornościowym szczególną uwagę zwraca się na cyklooksygenazy (COX) – enzymy zaangażowane w syntezę prostanoidów: prostaglandyn (PG), prostacykliny (PGI₂) i tromboksanu A₂ (TXA₂). Wyróżnia się dwie podstawowe izoformy COX: konstytutywną (COX-1), która odpowiada za podstawową syntezę prostaglandyn, oraz indukowaną (COX-2) której aktywność jest specyficzna dla procesów patofizjologicznych, w tym stanów zapalnych. Spośród znanych 12 prostaglandyn największą aktywność wykazują PGD₂, PGE₂ i PGF₂. Liczne badania wykazały, że PGE₂ jest niezwykle ważnym nośnikiem informacji między pobudzonym układem odpornościowym a ośrodkowym układem nerwowym. Działając wielokierunkowo uczestniczy w przekazywaniu informacji o zaburzeniach homeostazy organizmu.

Niesteroidowe leki przeciwzapalne (NLPZ) to duża i zróżnicowana grupa związków o działaniu przeciwbólowym, przeciwzapalnym i przeciwgorączkowym. Niektóre z nich, np. kwas acetylosalicylowy, hamując agregację płytek krwi działają także przeciwzkrzepowo. Molekularny mechanizm działania NLPZ polega na hamowaniu aktywności COX. Większość NLPZ działa nieselektywnie i hamuje

aktywność zarówno COX-1 jak i COX-2. W grupie NLPZ wyróżniamy także preferencyjne inhibitory COX-2 oraz leki wybiórczo hamujące ten izoenzym, tzw. koksyby. Należy podkreślić, że szereg NLPZ jest dostępnych bez recepty. Można je nabyć nie tylko w aptece, ale też w supermarkecie czy na stacji benzynowej. Nadużywanie NLPZ, w szczególności nioselektywnych inhibitorów COX, może prowadzić do wystąpienia szeregu objawów niepożądanych, a następnie do rozwoju licznych chorób.

Rozprawa doktorska mgr Napory wpisuje się w aktualny i bardzo ważny nurt badań nad skutkami długotrwałego stosowania leków hamujących aktywność cyklooksygenaz na przepływ informacji pomiędzy układem immunologicznym a ośrodkowym układem nerwowym. Podstawowym celem badań prowadzonych przez Doktoranta było określenie, czy długotrwałe hamowanie aktywności humoralnej drogi komunikacji nerwowo-odpornościowej (szlak PGE2/COX) może indukować zmiany funkcjonalne w drodze alternatywnej, neuronalnej, prowadząc do uruchomienia potencjalnych mechanizmów kompensujących to zaburzenie.

Układ pracy, struktura podziału treści i poruszane zagadnienia

Rozprawa doktorska składa się z liczącego 49 stron autoreferatu, dwóch prac oryginalnych stanowiących jej podstawę i jednej pracy przeglądowej:

Napora P, Kobrzycka A, Pierzchała-Koziec K, Wieczorek M. 2023. Effect of selective cyclooxygenase inhibitors on animal behaviour and monoaminergic systems of the rat brain. *Behavioural Brain Research*. 438(2023), 114143. doi.org/10.1016/j.bbr.2022.114143

Napora A, Kobrzycka A, Pierzchała-Koziec K, Wieczorek M. Effect of selective cyclooxygenase inhibitors on amino acid neurotransmitters of the rat brain. Manuskrypt w dniu 05.04.2023. przesłany do publikacji w *Behavioural Brain Research*,

Napora P, Kobrzycka A, Wieczorek M. 2020. Prostaglandyna E2 jako cząsteczka komunikacji pomiędzy układem nerwowym i odpornościowym. *Kosmos*. 69(2), 287-300. doi.org/10.36921/kos.2020_2559

Sumaryczny IF w/w prac wynosi 6,664, a liczba punktów MEiN – 220.

Układ autoreferatu ma klasyczny charakter: Wykaz stosowanych skrótów, Wprowadzenie, Cel pracy z uzasadnieniem podjętej tematyki badawczej, Materiały i metody badawcze, Omówienie wyników połączone z dyskusją, Wnioski,

Piśmiennictwo (106 starannie wybranych pozycji anglojęzycznych, w przeważającej części opublikowanych w okresie ostatnich 10 lat). Konstrukcję pracy należy uznać za logiczną i podkreślającą kolejność zagadnień, którymi zajmował się Doktorant.

Do rozprawy dołączono oświadczenia Doktoranta i współautorów w/w publikacji

Cel pracy

Podstawowym celem badań prowadzonych przez Doktoranta było określenie, czy długotrwałe hamowanie aktywności humoralnej drogi komunikacji nerwowo-odpornościowej doprowadzi do uruchomienia potencjalnych mechanizmów kompensujących jej zaburzenie oraz ustalenie ich charakteru.

Pan Napora analizował wpływ długotrwałego hamowania aktywności COX-1 i COX-2 u szczurów na:

- neurotransmisję monoaminergiczną i aminokwasową w mózgu,
- stężenia mediatorów reakcji zapalnej w osoczu krwi,
- zachowanie zwierząt.

Metodyka badawcza

Badania przeprowadzono na samcach szczurów stada nie krewniaczego Wistar.

Z mózgowia zwierząt wyizolowano następujące struktury: pień mózgu, podwzgórze, korę ciemieniową, hipokamp, przyśrodkową korę przedczołową, ciało migdałowate i istotę szarą okołowodociągową, które następnie wykorzystano do badań neurochemicznych i biochemicznych. Wszystkie procedury eksperymentalne, którym poddano zwierzęta zostały zaakceptowane przez Lokalną Komisję Etyczną w Łodzi.

Oznaczenia neuroprzekaźników monoaminergicznych i ich metabolitów, neuroprzekaźników aminokwasowych oraz pozostałych aminokwasów wykonano techniką wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detekcją elektrochemiczną (HPLC). Kortykosteron oznaczano metodą radioimmunologiczną (RIA). Do oznaczania stężenia cytokin prozapalnych w osoczu krwi wykorzystano metodę immunoenzymatyczną ELISA. Wpływ inhibitorów COX-1 i COX-2 na zachowanie zwierząt badano przy użyciu testu uniesionego labiryntu krzyżowego (ang. *elevated*

plus maze, EPM), który umożliwia ocenę aktywności lokomotorycznej oraz poziomu lęku.

Wyniki

Badania przeprowadzone przez Doktoranta wykazały, że w wyniku długotrwałego podawania szczurom inhibitora COX-1 (związku SC560) i celekoksylu – inhibitora COX-2 doszło do istotnych zmian w natężeniu ośrodkowej transmisji dopaminergicznej, noradrenergicznej i serotonergicznej, zmian w zawartości aminokwasów neuroprzebieżnikowych – asparaginy, glutaminy, glicyny i kwasu gamma-aminomasłowego (GABA), oraz aminokwasów będących prekursorami amin katecholowych (dopaminy i noradrenaliny) i serotoniny, odpowiednio tyrozyny i tryptofanu. Ponadto zaobserwowano, że blokowanie aktywności COX-2, ale nie COX-1, spowodowało zwiększenie aktywności lokomotorycznej zwierząt. Opis uzyskanych wyników został wzbogacony obszerną dyskusją i dwiema rycinami.

Wnioski

W oparciu o uzyskane wyniki Doktorant sformułował 10 poprawnych wniosków, z których za najbardziej interesujące uważam następujące:

- w wyniku długotrwałego hamowania aktywności cyklooksygenaz dochodzi do zwiększenia aktywności układu dopaminergicznego w obrębie kresomózgowia, zarówno w hipokampie, przyśrodkowej korze przedczołowej, podwzgórzu i w pniu mózgu;
- długotrwałe hamowanie aktywności COX-1 i COX-2 u zwierząt bez stanu zapalnego, powoduje wzrost natężenia transmisji serotonergicznej z jąder szwu do podwzgórza i przyśrodkowej kory przedczołowej;
- blokowanie humoralnej drogi komunikacji nerwowo-odpornościowej, przez zahamowanie aktywności cyklooksygenaz, uruchamia mechanizmy kompensujące to zaburzenie;
- zaburzenie homeostazy narządów wewnętrznych, spowodowane długotrwałym podawaniem inhibitorów cyklooksygenaz lub wywołanie eksperymentalnego stanu zapalnego, prowadzi do rozwoju *sickness behaviour*. Objawia się to

spadkiem zawartości glutaminianu w podwzgórzu, co z kolei może wpływać na obniżenie pobierania pokarmu ze środowiska;

- stosowanie inhibitorów cyklooksygenaz indukuje *sickness behaviour* poprzez obniżenie zawartości glicyny oraz GABA w podwzgórzu. Spadek zawartości GABA jest odpowiedzialny za obniżenie pobierania pokarmu przez zwierzęta. Natomiast spadek stężenia glicyny może powodować ograniczenie aktywności seksualnej zwierząt, co w konsekwencji prowadzi do zwiększenia rezerw energetycznych organizmu;
- hamowanie aktywności COX-1 lub COX-2 podczas eksperymentalnie wywołanego stanu zapalnego poprzez zmiany w wydzielaniu kortykosteronu wpływa odmiennie na kontrolę aktywności układu;
- hamowanie aktywności COX-1 prowadzi do obniżenia zawartości asparaginianu oraz glutaminianu w istocie szarej okołowodociągowej, co może prowadzić do osłabienia somatycznych reakcji obronnych oraz odpowiedzi nocycyptywnej.

Uwagi:

Str. 7 ...dochodzi do uwolnienia fosfolipidów błonowych, w tym kwasu arachidonowego (ang. *arachidonic acid*, AA). Kwas arachidonowy jest **uwalniany z błonowych fosfolipidów** przez fosfolipazę A2

Podsumowanie

Przedłożona mi do recenzji rozprawa doktorska Pana mgr Pawła Napory jest opracowaniem, które oceniam pozytywnie. Drobnym błędem merytorycznym w autoreferacie nie umniejsza wysokiej wartości dysertacji. Treść rozprawy doktorskiej potwierdza, że Pan Napora posiada dużą wiedzę z zakresu neurofarmakologii i immunologii. Ponadto dysponuje bardzo dobrym warsztatem metodologicznym, potrafi właściwie zaplanować i przeprowadzić prace doświadczalne oraz analizować dane i zinterpretować uzyskane wyniki. To wszystko potwierdza umiejętność Doktoranta w zakresie samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Rozprawa doktorska Pana mgr Pawła Napory stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, jest bardzo wartościowa i dotyczy zagadnień stosunkowo słabo poznanych. Podjęte badania uważam za uzasadnione i stanowiące istotny wkład w rozwój nauk biologicznych.

Rozprawa doktorska mgr farm. Pawła Napory spełnia warunki określone w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce.

Wnoszę do Komisji Uniwersytetu Łódzkiego ds. Stopni Naukowych w dyscyplinie nauki biologiczne o dopuszczenie mgr Pawła Napory do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia naukowego doktora.

Jednocześnie biorąc pod uwagę wielopłaszczyznowe podejście do analizowanych zjawisk, wysoki poziom merytoryczny pracy, wyróżniającą jakość przeprowadzonych badań oraz fakt, że część uzyskanych wyników została opublikowana w czasopiśmie naukowym z listy JCR posiadającym 100 pkt. MEiN, a Doktorant jest pierwszym autorem pracy składam wnioszek o wyróżnienie rozprawy doktorskiej Pana Pawła Napory.

KIEROWNIK
Zakładu Farmakodynamiki
Katedry Biofarmacji
Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

prof. dr hab. n. farm. Jolanta B. Zawilska