

Warszawa 17.07.2023

RECENZJA

Rozprawy Doktorskiej mgr. Pawła Napory

p.t. „Kompensacja komunikacji nerwowo-odpornościowej po zahamowaniu aktywności cyklooksygenaz”

Rozprawa doktorska mgr Pawła Napory przedstawia wyniki badań długotrwałych skutków stosowania niesteroidowych leków przeciwzapalnych (NLPZ), których działanie jest zależne od blokowania aktywności cyklooksygenaz. Autor badał zachowanie szczurów, u których zahamowano aktywność cyklooksygenaz COX-1 i COX-2 przed i po wywołaniu stanu zapalnego, oraz poziom aktywności układów neuroprzekaźników monoaminergicznych i aminokwasowych mózgu. Praca ta została wykonana w Katedrze Neurobiologii Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego. Promotorem rozprawy doktorskiej jest dr hab. Marek Wiczorek, prof. UŁ.

Recenzowana przeze mnie rozprawa doktorska jest zbiorem trzech publikacji poprzedzonych 46-stronicowym tekstem. Podstawą rozprawy są: jedna praca przeglądowa opublikowana w czasopiśmie Kosmos, jedna praca oryginalna opublikowana w czasopiśmie Behavioural Brain Research (Impact Factor 3.35) oraz jedna praca oryginalna będąca w procesie recenzowania i publikacji w tym samym czasopiśmie. We wszystkich publikacjach Doktorant jest pierwszym autorem, ponadto dołączono oświadczenia współautorów poświadczające wiodącym udział mgr Pawła Napory w powstawaniu tych prac. Praca przeglądowa została opublikowana w roku 2020, w czasopiśmie Kosmos wydawanym w języku polskim, a praca doświadczalna w Behavioural Brain Research ukazała się w roku 2023 i z tego powodu nie jest jeszcze cytowana, jednak nie wątpię, że badania Autora są bardzo ważne i mam nadzieję że będą zauważone przez naukowców. Wyniki przedstawione w tej rozprawie doktorskiej są szczególnie cenne dla praktyki medycznej, ze względu na zastosowane inhibitory COX, którymi są niesterydowe leki przeciwzapalne szeroko używane w leczeniu bólu i gorączki.

Artykuły składające się na recenzowaną pracę dokorską zostały poprzedzone 46-stronicowym tekstem będącym wprowadzeniem i komentarzem do rozprawy. Tekst ten składa się ze Spisu treści, Spisu publikacji i manuskryptów wchodzących w skład rozprawy doktorskiej, Wykazu skrótów, Wprowadzenia, Celu rozprawy doktorskiej, opisu Materiałów i metod badawczych, Omówienia wyników, Wniosków, Streszczenia w językach polskim i angielskim oraz spisu Piśmiennictwa. Wprowadzenie liczy ponad 4 strony tekstu. Doktorant

podkreśla w nim ważną rolę układu odpornościowego w utrzymywaniu homeostazy organizmu, czyli zachowywaniu równowagi procesów zachodzących w organizmie, mimo zmiennych warunków zewnętrznych. Następnie opisuje mechanizmy indukcji stanu zapalnego wywołanego inwazją patogenów, a szczególną uwagę zwraca na szlak metaboliczny fosfolipidów znajdujących się w błonach komórkowych, w szczególności kwasu arachidonowego, który jest substratem różnych enzymów, w tym cyklooksygenaz COX-1 i COX-2, które przetwarzają je na prostaglandynę E2 (PGE2), związek produkowany podczas odpowiedzi zapalnej, który dociera do ośrodkowego układu nerwowego (OUN) uruchamiając procesy przeciwzapalne, konieczne dla utrzymania równowagi między procesami pro- i przeciwzapalnymi. Doktorant pisze o potwierdzeniu istnienia trzeciej izoformy cyklooksygenazy COX-3 w korze mózgu człowieka i psa, i cytuje prace, opublikowane w latach 2002 i 2005. W ostatnich latach ukazały się prace, które pokazują, że COX-3 jest izoenzymem kodowanym przez ten sam gen co COX-1 i dokumentują obecność COX-3 w mózgach gryzoni. Jego ekspresję wykryto w wielu strukturach mózgu szczura: w przysadce mózgowej, podwzgórzu, hipokampie, rdzeniu przedłużonym, mózdzku i korze mózgu szczura. Ogólnie, wstęp jest napisany kompetentnie i interesująco.

W kolejnym podrozdziale mgr Napora określa cel rozprawy doktorskiej opisując ważną rolę, jaką pełni produkt aktywności enzymatycznej cyklooksygenaz, PGE2, w przekazywaniu informacji do OUN i wpływ zwiększenia przez niego aktywności układu odpornościowego na funkcjonowanie całego organizmu, np. podwyższenie temperatury ciała czy zmianę zachowania wywołaną patogenem (ang. sickness behaviour). Po Wprowadzeniu, Autor formułuje hipotezę badawczą i definiuje cel główny, którym jest sprawdzenie hipotezy. Cele dodatkowe wyjaśniają, jak ma być testowana hipoteza, czyli opisują szczegółowe cele badawcze. Tak więc, podstawowym celem pracy było określenie wpływu długotrwałego zahamowania aktywności COX-1 oraz COX-2 na przekąźnictwo monoaminergiczne i aminokwasowe w OUN szczura. Jednak w rozdziałach Wprowadzenie oraz Cel rozprawy doktorskiej nie znalazłam informacji o wpływie cyklooksygenaz na neurotransmisję monoaminoergiczną, ani też aminokwasową. Także kolejność celów powinna być moim zdaniem inna. Pierwszym celem powinno być sprawdzenie potencjalnych zmian stężenia mediatorów reakcji zapalnej w osoczu krwi po długotrwałym zahamowaniu aktywności cyklooksygenaz, dalej powinny być sformułowane pozostałe cele. Na str. 12 Doktorant pisze, że przedstawione cele zostały zrealizowane i omówione w dwóch załączonych pracach, a w kolejnym akapicie wyjaśnia cel pracy przeglądowej (Praca 1), której omówienie powinno moim zdaniem znaleźć się w rozdziale Wprowadzenie. Następnie Doktorant szczegółowo opisuje cele Prac 2 i 3, pisząc między innymi, że dziesięciodniowy cykl podawania odpowiednich inhibitorów był wystarczający, by zahamować odpowiednie enzymy. Zdaniem Autora cykl taki zapobiega również „powstawaniu nadmiernych zaburzeń pracy narządów wewnętrznych u badanych zwierząt”. Ponieważ Autor nie badał żadnych innych narządów poza mózgiem, jest to prawdopodobnie wniosek wyciągnięty z literatury, czego jednak Autor nigdzie nie omawia.

Następny podrozdział Rozprawy jest zatytułowany „Materiał i metody badawcze”. Do badań wykorzystano trzymiesięczne samce szczurów Wistar. Przed rozpoczęciem doświadczeń zwierzęta zostały umieszczone w oddzielnych klatkach. Mam tu uwagę krytyczną. Wiadomo, że szczury są zwierzętami społecznymi i izolacja od innych zwierząt jest dla nich (a także innych gryzoni społecznych) stresująca. Niekorzystne skutki przebywania w pojedynczych klatkach są liczne i znane od wielu lat i mogą zagrażać wiarygodności i powtarzalności wyników. Jest to szczególnie ważne w badaniach

behawioralnych, gdy zakładamy że wyniki uzyskane w grupach kontrolnych odzwierciedlają „stan normalny”. Ponadto, jeśli wyniki tych doświadczeń mają być przenoszone na ludzi, którzy również są gatunkiem społecznym, to logiczne było by badanie szczurów żyjących w warunkach społecznych. Druga krytyczna uwaga odnosi się do ilości podawanego lipopolisacharydu (LPS). Każdy szczur, ważący średnio 250 g, dostał 10 µg LPS, czyli Autor stosował dawkę 40 µg/kg. W literaturze znalazłam, że Autorzy wywołujący stan zapalny u szczurów i obserwujący potem zmiany w ich zachowaniu, używają zazwyczaj dawki LPS 100 µg/kg lub większej, a w pracach opublikowanych w ciągu ostatnich dziesięciu lat nie znalazłam przypadku podawania szczurom 40 µg/kg lub mniejszej dawki LPS. Chciałabym więc zapytać, na jakiej podstawie wybrano taką dawkę LPS? Czym można wytłumaczyć to, że autorzy innych opublikowanych prac, kiedy stosowali mniejsze niż 100 µg/kg dawki LPS (np. Bassi et al., 2012), nie stwierdzali zmian zachowania zwierząt w EPM?

Najistotniejszym rozdziałem pracy doktorskiej jest Omówienie wyników, które zaczyna się zdaniem: „Ze względu na dużą liczbę danych uzyskanych w przeprowadzonym doświadczeniu opisane zostały wyniki porównań międzygrupowych, które wykazały istotność statystyczną”. Nie wiem czy była to słuszna decyzja, bo czasami wyniki statystycznie nieistotne wskazują, wykluczają zaangażowanie pewnych mechanizmów w badany proces. Rozdział Omówienie wyników składa się z podrozdziałów z których każdy przedstawia określone zagadnienie. Przy opisywaniu konkretnych wyników Autor nie cytuje odpowiednich tabel lub rysunków w opublikowanych w pracach (Pracy 2 i 3). Zacytowanie tych rysunków lub tabeli zwiększyło by przejrzystości tekstu i ułatwiło jego odbiór, zwłaszcza przez recenzentów. Biorąc pod uwagę, że wyniki badań trzech cytokin prozapalnych (IL-6, IL-1β i TNF-α) są opisane w dwóch różnych pracach (Pracy 2 i 3), to brak odniesień do rycin i tabeli w tych pracach utrudnia porównanie wyników. Stężenia IL-6 u różnych grup zwierząt przedstawiono jedynie w formie wykresów (Praca 2), natomiast wyniki dla IL-1β i TNF-α oprócz przedstawienia stężenia w formie wykresów, mają dodatkowo w tabeli podane wyniki analizy statystycznej, co bardzo doceniam. Dołączenie podobnej tabeli dla IL-6 oraz podanie bezwzględnych wartości stężenia IL-6 w rozdziale 4.2 *Cytokiny prozapalne* zwiększyło by przejrzystość tych wyników. Na str. 17 Doktorant stwierdza, że stężenie cytokiny TNF-α spada u zwierząt długotrwale otrzymujących SC560, inhibitor COX-1. Jednak na rycinie 9 Pracy 3 tych wyników nie pokazano. Przedstawione wyniki wskazują, że stężenie TNF-α nie różniło się znacząco u trzech grup zwierząt: kontrolnej (CNT), zwierząt u których zahamowano aktywność enzymu COX-1 (iniekcje SC560-NaCl) i tych, u których zahamowano aktywność COX-2 (CEL-NaCl).

W kolejnych podrozdziałach opisano odpowiedź układu monoaminergicznego w różnych strukturach mózgu, głównie związanych z układem limbicznym, u szczurów po długotrwałym zahamowaniu aktywności COX-1 i COX-2. Połowa szczurów z każdej grupy dostała iniekcję LPS, w celu wywołania u nich stanu zapalnego. Wyniki badań przy użyciu HPLC wykazały wpływ zahamowania aktywności cyklooksygenaz na przekąźnictwo noradrenalinergiczne, dopaminergiczne i serotoninericzne w różnych strukturach mózgu. Wyniki te są opisane w Pracy 2, która została opublikowana w dobrym, recenzowanym czasopiśmie. Z obowiązku recenzenta przedstawię moje uwagi krytyczne do doktoratu i prac, na których jest oparty, zaczynając od Pracy 2. Nie wiem, czym się kierowali Autorzy zaczynając opis wyników od cytokin, które to wyniki ku mojemu zaskoczeniu przedstawione są nie na rycinie 1, a na rycinie 8 (Fig. 8). Jako drugie zostały opisane wyniki badania zachowania zwierząt w teście podwyższonego labiryntu krzyżowego (EPM), podczas gdy opis tych wyników jest przedstawiono na rycinach 10, 1 i 9. Następnie przedstawiono wyniki

badania metabolizmu noradrenaliny (Fig. 4) i t.d. Chciałabym wiedzieć, czym była spowodowana kolejność cytowania w pracy rycin w kolejności: 8, 10, 1, 9, 4, 5, 6, 7, 2 i 3? Nigdy się z czymś takim dotąd nie spotkałam. Druga moja uwaga edytorska odnosi się do wykresów stężenia monoamin. Jednostkę wartości dla osi Y - [ng/g] -opisano w poziomie, a nie przy osi Y. Ponadto, oś Y dla monoamin kończy się na wartości 9, a dla ich metabolitów maksymalną wartością osi Y jest 3. To powoduje, że rysunek jest mylący, ponieważ sugeruje, że różnice są większe niż w rzeczywistości. Zdaję sobie sprawę, że prawdopodobnie zrobiono tak po to, by różnice były bardziej widoczne. Jednak dla porównania poziomów monoamin i ich metabolitów wykresy muszą mieć takie same wartości na osi. Następna, merytoryczna uwaga odnosi się do zmian, które są statystycznie istotne, ale różnice są bardzo małe np. wyniki przedstawione na rycinie 7 (Praca 2), pokazujące metabolizm serotoniny w podwzgórzcu i przyśrodkowej części kory. Takich wyników jest więcej. Wydaje mi się, że stwierdzone różnice te są tak małe, że mogą mieścić się w granicach błędów pomiarowego HPLC, więc nie należało nadawać im większego znaczenia.

Następnie Doktorant omawia wyniki doświadczeń w teście uniesionego labiryntu krzyżowego (EPM), mających na celu sprawdzenie poziomu aktywności lokomotorycznej i lęku oraz preferencji do zajmowania określonego miejsca wewnątrz aparatu testowego. Test ten służy zazwyczaj do testowania poziomu lęku i ciekawości u zwierząt. Popieram analizowanie także dodatkowych parametrów zachowania się zwierząt w tym teście, takich jak aktywność lokomotoryczna czy preferencja do zajmowania określonego miejsca, jednak w moim przekonaniu bez zastosowania innych, bardziej specyficznych testów, takich jak test otwartego pola do badań lokomotorycznych czy test socjalny do określenia preferowanego miejsca, z wyników tych nie można wyprowadzać zbyt daleko idących wniosków. Na str. 25 w podrozdziale zatytułowanym „Preferencja miejsca jako potencjalny wskaźnik zachowań socjalnych” Doktorant omawia wyniki ustalania preferencji zwierząt do zajmowania określonego miejsca w teście EPM i zakłada, że zwierzęta unikają miejsc, w których przebywały szczury które dostały LPS, czyli potencjalnie chore. Badania innych autorów pokazują, że samice myszy unikają „chorych” samców myszy (tych, którym poddano LPS), ponieważ ich zapach jest nieatrakcyjny dla samic. A w doświadczeniach przeprowadzonych na samcach szczurów, którym poddawano iniekcje LPS wykazano, że czas spędzany na interakcjach społecznych nie zmienia się, zachodzi natomiast samoizolacja (“self social isolation”): „chore” zwierzęta wybierają najbardziej oddalone od sąsiada miejsce w klatce (Yee i Prendergast, 2012). W badaniach Doktoranta wykorzystano tylko samce szczurów, które pozostawały w aparacie testowym przez bardzo krótki czas (5 min), ponadto nie stwierdzono, czy wszystkie „chore” szczury oddawały mocz podczas tego doświadczenia. Poza tym, po wykonaniu testu aparat za każdym razem był dezynfekowany. Myślę, że w tym miejscu dobrze było by wykonać np. test interakcji socjalnych, wyniki którego pozwoliłyby wyciągnąć odpowiednie wnioski. Uważam więc, że wnioskowi umieszczonego na str. 41 – (osobniki „zdrowe”, unikają zapachu zwierząt, u których doszło do potencjalnego zaburzenia homeostazy narządów wewnętrznych. Prawdopodobne jest to efektem rozwiniętego narządu węchu u szczurów oraz obecność specyficznych białek w moczu osobników „chorych”, które poprzez ich obecność nieświadomie sygnalizują zagrożenie) nie można wyciągnąć na podstawie uzyskanych wyników, co nie znaczy, że jest on nieprawdziwy.

Pozostałe podrozdziały przedstawiają wyniki badania wpływu blokowania aktywności cyklooksygenaz COX-1 i COX-2 na aktywność aminokwasowych układów *neurotransmisyjnych* w *niektórych strukturach mózgu*. Doktorant przeprowadził bardzo szeroki zakres analiz, badając stężenia wszystkich badanych aminokwasów: asparagianu,

glutaminianu, glicyny i kwasu gamma-aminomasłowego (GABA) oraz prekursorów neuroprzekazników - tyrozyny i tryptofanu, w ciele migdałowatym, pniu mózgu, hipokampie, podwzgórzcu i istocie szarej okołowodociągowej. Nie jest dla mnie jasne, jakie kryteria zdecydowały o wyłączeniu z tych badań kory mózgowej. Z literatury wiadomo, że jest ona jedną z nielicznych struktur mózgu, w neuronach której COX-2 ulega ekspresji. Więc choćby z tego powodu konieczne było według mnie zbadanie kory mózgowej. Wyniki badania wpływu blokowania aktywności cyklooksyzgenaz COX-1 i COX-2 na aktywność aminokwasowych układów neurotransmisyjnych zostały opisane w Pracy 3. W opisie metod tej pracy Doktorant nie wyjaśnia, czy analizował badane stężenia w każdej z półkul mózgowych osobno, czy razem. Ciało migdałowate prawej i lewej półkuli nie jednakowo odpowiadają na różne bodźce, więc stężenia badanych aminokwasów mogło być w nich różne. Z kolei dyskusja tej pracy jest moim zdaniem zbyt długa, miejscami wyniki są nadinterpretowane i nie są bezpośrednio poparte uzyskanymi wynikami. Pominięto natomiast dyskusję na temat długotrwałych skutków podawania inhibitorów COX (SC560 i celekoksyb), które nie wywoływały zmiany stężenia badanych cytokin IL-1 β i TNF- α .

Podsumowując, mimo tych zastrzeżeń z pełnym przekonaniem stwierdzam, że przedłożona do recenzji rozprawa doktorska mgr Pawła Napory p.t. „Kompensacja komunikacji nerwowo-odpornościowej po zahamowaniu aktywności cyklooksyzgenaz” spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r., poz.478,619, 1630). Na tej podstawie wnoszę do Komisji UŁ ds. stopni naukowych w dyscyplinie nauki biologiczne o dopuszczenie mgr Pawła Napory do dalszych etapów postępowania doktorskiego.

Dr. hab. Ruzanna Djavadian (Dżawadian)

