

Dr hab. Marek Wieczorek, prof. UŁ

Katedra Neurobiologii

Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska

Uniwersytetu Łódzkiego

Ocena pracy doktorskiej Pani mgr farm Katarzyny Alicji Kuczyńskiej pt.:

Ocena neurotoksyczności MDPV (3,4-metylenodioksyfawaleronu) podawanego w okresie rozwoju ośrodkowego układu nerwowego u myszy

Podstawa prawna przygotowanej oceny:

pismo Przewodniczącej Rady Nauk Farmaceutycznych Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, Pani prof. dr hab. n. med. Anny Kilanowicz-Sapota z dnia 17 lipca 2024 r. o powierzeniu mi funkcji recenzenta rozprawy doktorskiej mgr farm. Katarzyny Kuczyńskiej.

Pani mgr Katarzyna Kuczyńska wyniki badań, na podstawie których przygotowała swoją pracę doktorską, uzyskała w Zakładzie Farmakodynamiki Uniwersytetu Medycznego w Łodzi oraz Pracowni Białek Wiązujących Wapń Instytutu Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego PAN w Warszawie.

Doktorantka jest współautorką jedenastu prac o łącznym współczynniku oddziaływania $IF=27.16$ i łącznej liczbie punktów $MNiSW=825$. Prace Pani magister Kuczyńskiej, zgodnie z Web of Science, były cytowane 211 razy, 209 bez autocytowań, natomiast według Scopus 238 razy, 236 bez autocytowań. Indeks h, według obu baz wynosi 6. Pani mgr Kuczyńska jest współautorką jednego rozdziału w książce, $MNiSW=20$ pkt oraz dwóch komunikatów zjazdowych. W ramach programu *Young Investigator Training Program – ADDICTON 2022* odbyła miesięczny staż naukowy w Laboratorium Toksykologii i Medycyny Sądowej w Zakładzie Medycyny Translacyjnej na Uniwersytecie w Ferrarze we Włoszech.

Pani mgr Kuczyńska, w latach 2020, 2021 i 2022, otrzymała nagrody Rektora, odpowiednio II i III stopnia, za opublikowane prace oryginalne.

Przedstawiona do oceny praca doktorska jest typowym manuskrytem, w którym Doktorantka w kolejności umieściła *Wykaz skrótów, Wstęp, Cel pracy, Materiał i metody, Wyniki, Dyskusję, Wnioski, Streszczenie w języku polskim i angielskim, Piśmiennictwo, Wykaz tabel oraz Wykaz rycin*. Dodatkowo Pani magister Kuczyńska dołączyła *Całkowity dorobek naukowy oraz Oświadczenie współautorów publikacji*. Nie mam zastrzeżeń co do struktury manuskryptu.

Doktorantka, w przeprowadzonych badaniach, podjęła się sprawdzenia czy i jakie są skutki oraz mechanizmy neurobiologiczne ekspozycji myszy na syntetyczne katynony, które oddziałują na ich organizm w okresie rozwoju ośrodkowego układu nerwowego (OUN). Badania podjęte przez Panią mgr Kuczyńską są wyjątkowo ważne, ponieważ odnotowano wcześniej negatywny wpływ klasycznych psychostymulantów na funkcje poznawcze oraz pamięć u dzieci, których matki w okresie ciąży stosowały narkotyki należące do tej grupy. Podobne efekty zaobserwowano w przypadku gryzoni, które w okresie rozwoju OUN poddano ekspozycji na narkotyki o działaniu psychostymulującym. W efekcie tych działań stwierdzono zaburzenia pamięci u młodych i dorosłych zwierząt. Warto przy tym zauważyć, że długotrwałe zażywanie pochodnych katynonu zwykle prowadzi do uzależnienia oraz wystąpienia objawów odstawiennych. Również po zaprzestaniu ich zażywania niektóre objawy, jak choćby obniżenie nastroju oraz zaburzenia funkcji poznawczych i pamięci, mogą się utrzymywać przez długi czas. Jeszcze groźniejszym jest stosowanie tych substancji przez kobiety w ciąży. Z badań klinicznych wynika, że u niemowląt oraz u dzieci matek, które podczas ciąży zażywały psychostymulanty, obserwowane są zaburzenia procesów poznawczych oraz pamięci. Stwierdzono między innymi podwyższony poziom stresu u noworodków, z kolei u dzieci oraz u nastolatków zaobserwowano problemy z nauką, niższy iloraz inteligencji jak też zaburzenia różnych rodzajów pamięci. Stwierdzono także zmiany morfologiczne w mózgach dzieci, których matki w okresie ciąży zażywały narkotyki o charakterze psychostymulantów, co szczególnie wyraźnie widać choćby w obrębie formacji hipokampa. Zaobserwowano również zmiany na poziomie receptorowym, zwłaszcza w obrębie receptorów dla dopaminy i serotoniny. Stwierdzono również wzrost stężenia kortykosteroidów, co jak wiadomo wiąże się ze zmianami

morfolologicznymi komórek nerwowych w obrębie formacji hipokampa i może prowadzić do zaburzeń nastroju i depresji. Są to jedynie niektóre następstwa zażywania psychostymulantów przez matki w okresie ciąży. Szczegółowy ich opis przedstawiła Pani mgr Kuczyńska we wstępie do swojej pracy doktorskiej. Chcę podkreślić, że wstęp przygotowany przez Doktorantkę jest niezwykle interesujący i moim zdaniem napisany w sposób wyjątkowo logiczny oraz stanowi bardzo dobrą analizę badanego problemu.

Mając na uwadze wspomniane wpływy narkotyków o charakterze psychostymulantów, Doktorantka postanowiła sprawdzić ewentualny wpływ syntetycznej pochodnej katynonu, *MDPV (3,4-metylenodioksirowaleronu)* podawanego myszom w okresie kształtowania się OUN, na rozwój oraz funkcje hipokampa, a także procesy poznawcze i pamięć zwierząt po osiągnięciu dorosłości. Uważam, że cel badań wybrany przez Doktorantkę jest wyjątkowo ważny, szczególnie że obserwujemy ciągły wzrost popytu i podaży narkotyków klasycznych jak również nowych substancji uzależniających, w tym także pochodnych katynonu. W podsumowaniu przedstawionego celu podjętych badań zabrakło mi jednak wyraźnie sformułowanej hipotezy badawczej. Wierzę, że Pani mgr Kuczyńska przedstawi ją podczas prezentacji tej pracy doktorskiej w czasie publicznej obrony.

Nie mam zastrzeżeń do warsztatu metodycznego zastosowanego przez Doktorantkę w celu rozwiązania poszczególnych zadań cząstkowych przeprowadzonego eksperymentu. Zarówno wybór modelu zwierzęcego, jak też kolejno stosowane testy behawioralne nie budzą wątpliwości. Pozwalają one bowiem uzyskać wiarygodne dane, na podstawie których można sformułować wnioski końcowe z przeprowadzonych doświadczeń. Muszę podkreślić, że jestem pod wrażeniem profesjonalizmu Pani mgr Kuczyńskiej, która świetnie poradziła sobie z choćby tak trudnym do przeprowadzenia testem i interpretacji uzyskanych danych, jakim jest labirynt wodny Morrisa. Jedynie wiodące laboratoria światowe decydują się na zastosowanie tego testu behawioralnego. Co równie ważne, Doktorantka szczegółowo opisała kolejne etapy postępowania ze zwierzętami, które poddała temu testowi. Stanowi to dobry przykład dla odpowiedzialnego badacza, który swoim doświadczeniem pragnie podzielić się z innymi.

W rozdziale *Wyniki*, uzyskane dane Pani mgr Kuczyńska przedstawiła w formie dwudziestu dziewięciu wykresów, na których zamieściła wartości średnie oraz błąd standardowy, a także w przypadku większości z nich rozkład zmiennych z poszczególnych

doświadczeń. Chciałbym w tym miejscu zapytać, czy Doktorantka brała o pod uwagę możliwość przedstawienia danych w formie wykresu *ramka-wąsy*, na którym uwidoczniła by była mediana, kwartyle oraz rozstęp. Mam także pytanie dotyczące opisu wyników nauki przestrzennej lokalizacji platformy, strona 72. Pani mgr napisała, że: *Wykazano brak wpływu płci na (...) długość przebytego dystansu ($F(4,248) = 43.924; p < 0.001$), (...)*. W przypadku tego parametry zamieszczony wynik przeprowadzonej analizy statystycznej wskazuje na istotność, chciałbym zatem zapytać, skąd ta rozbieżność?

Mam także kilka uwag dotyczących technicznej strony zamieszczonych wykresów. Liczba danych, które są na nich zamieszczone jest tak duża, że są one trudne do interpretacji. Być może warto je było zamieścić w układzie poziomym, co uczyniłoby je większymi i przez to łatwiejszymi do analizy. Na stronie 79. znalazłem niezręczne sformułowanie *powtórzonych pomiarów wyników*.

W podrozdziale *Bierne unoszenie się na powierzchni wody* na stronie 88. znajduje się następujące zdanie *Dlatego począwszy od fazy nauki przestrzennej lokalizacji platformy (...)*. Chciałbym zapytać, czy ten wydłużony bezruch nie mógł być spowodowany wpływem podawania MDPV w dniach PD11-20?

Proszę również o odniesienie się do danych, które Pani magister przedstawiła na rycinie 44. Co prawda są to dane nieistotne statystycznie, jednakże daje się zauważyć pewne różnice pomiędzy samcami i samicami dotyczące poziomu ekspresji białka gęstości synaptycznej. Czy ten wynik może mieć związek z liczebnością grup doświadczalnych, a także czy samice wykorzystywane w badaniu były na tym samym etapie cyklu rujowego?

Pragnę podkreślić odpowiedzialność naukową Doktorantki oraz Jej krytyczne podejście do uzyskanych danych doświadczalnych, co znajduje odzwierciedlenie w zamieszczonej w pracy dyskusji. Autorka w sposób wyważony i zarazem krytyczny konfrontuje badania własne z danymi opublikowanymi przez innych badaczy. Zwróciła również uwagę, że związek zastosowany w obecnych badaniach może prowadzić do zmian o charakterze depresji, jednakże na obecnym etapie jest to jedynie założenie. Zgadzam się z Panią mgr Kuczyńską, że w jednym doświadczeniu nie można zbadać wszystkiego. Bowiem ze względu na specyfikę zaplanowanych eksperymentów, Pani magister nie mogła przeprowadzić testów behawioralnych, które dałyby możliwość oceny motywacji i w konsekwencji zmian nastroju

oraz depresji, jako przykład przytaczając między test Porsolta. Chciałbym zapytać Panią magister, jaka jest jej ocena tego testu szczególnie, że toczy się dyskusja dotycząca jego walidacji i przydatności w badaniach. Dyskusja ta dotyczy także etycznej strony eksperymentów z wykorzystaniem tego testu.

W moim przekonaniu, dane doświadczalne uzyskane przez Panią magister Kuczyńską są wyjątkowo wartościowe i upoważniają Ją do sformułowania wniosków końcowych. Mam jednak odczucie, że ostatni wniosek może być zbyt daleko idącym. Tym bardziej, że zarówno analizy molekularne jak też histologiczne dotyczą jedynie zmian na poziomie formacji hipokampa.

Kończąc moją ocenę chciałbym zwrócić uwagę na kilka „potknięć” edycyjnych:

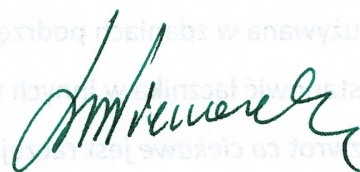
- „sól fizjologiczna” to 0.9% roztwór chlorku sodu,
- w języku polskim słowo *czy* ma charakter partykuły pytajnej i jako spójnik może być używana w zdaniach podrzędnych, które mają charakter pytań, zatem nie powinno ono stanowić łącznika w innych typach zdań,
- zwrot *co ciekawe* jest raczej sformułowaniem potocznym, a nie naukowym,
- na ryc. 4. zabrakło informacji o powiększeniu,
- na stronie 56. podano: *w 2-krotnie stężonym roztworze soli fizjologicznej* jakie to stężenie?,
- na stronie 61. dwukrotnie powtórzono tę samą frazę: *dwuczynnikową analizę wariancji (podany związek x płęć)*,
- na stronie 103 nie objaśniono skrótu *VTA*.

Przedstawione wyżej uwagi w żadnym stopniu nie umniejszają mojej pozytywnej oceny przeprowadzonych badań oraz przedstawionego manuskryptu pracy doktorskiej.

Podsumowując pragnę stwierdzić, że przedstawiona do oceny praca doktorska Pani mgr Kuczyńskiej jest rzetelnym opracowaniem naukowym dotyczącym wpływu pochodnej katynonu *MDPV (3,4-metylenodioksy-pirowaleronu)* na rozwijający się ośrodkowy układ nerwowy myszy. W szczególności Doktorantka wykazała, że badany związek jest

odpowiedzialny za zaburzenia różnych rodzajów pamięci. Nie stwierdziła natomiast zaburzeń procesu neurogenezy oraz plastyczności synaptycznej. Wskazała na możliwość oddziaływania MDPV na obniżenie motywacji w efekcie pogarszającej się tolerancji przewlekłego stresu. Wyniki uzyskane przez Panią mgr Kuczyńską są ważnym wkładem badawczym, który może doprowadzić do lepszego zrozumienia mechanizmów oddziaływania pochodnej katynonu na rozwijający się ośrodkowy układ nerwowy i późniejsze tego konsekwencje. W mojej ocenie przeprowadzone przez Nią badania mają wyjątkowo istotne znaczenie i tym samym moja ocena recenzowanej pracy jest wysoce pozytywna.

Stwierdzam, że praca doktorska Pani magister farmacji Katarzyny Kuczyńskiej spełnia warunki określone w art. 187 ust. 1 i 2 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2018 poz.1668 ze zm.). Tym samym wnoszę do Rady Nauk Farmaceutycznych Uniwersytetu Medycznego w Łodzi o dopuszczenie Pani magister Katarzyny Kuczyńskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Łódź, 27 września 2024 r.

Dr hab. Marek Wieczorek, prof. UŁ