



Kraków 3.12.2024

Prof. dr hab. n. med. Irena Nalepa
Zakład Biochemii Mózgu
Instytut Farmakologii im. Jerzego Maja PAN
e-mail: nfnalepa@cyf-kr.edu.pl

Recenzja rozprawy doktorskiej

**zatytułowanej: „Ocena neurotoksyczności MDPV (3,4-metylenodioksyfawaleronu)
podawanego w okresie rozwoju ośrodkowego układu nerwowego u myszy”
autorstwa mgr farm. Katarzyny Alicji Kuczyńskiej**

Praca doktorska Pani mgr Katarzyny Kuczyńskiej została wykonana w Zakładzie Farmakodynamiki, Katedry Biofarmacji Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi. Promotorem rozprawy jest dr hab. n. farm. Jakub Wojcieszak.

Przedmiot rozprawy i uzasadnienie podjęcia tematu

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska opisuje wyniki badań, których bezpośrednim celem było scharakteryzowanie wpływu syntetycznego katynonu, MDPV, podawanego myszom pomiędzy 11 a 20 dniem postnatalnym na rozwój i funkcję hipokampa oraz procesy poznawcze i pamięć dorosłych zwierząt. Kierowany przez promotora rozprawy, dr hab. Jakuba Wojcieszaka, Zakład Farmakodynamiki ma wieloletnią tradycję badań nad różnymi substancjami psychoaktywnymi, zapoczątkowanych w Zakładzie jeszcze przez poprzednią kierowniczkę, Panią prof. dr hab. n. farm. Jolantę B. Zawilską, a także znaczące doświadczenie metodyczne w farmakologicznych i biochemicznych analizach efektów substancji psychoaktywnych oraz duże osiągnięcia publikacyjne w tej tematyce. Omawiana praca doktorska wpisuje się więc w jeden z głównych nurtów badawczych Zakładu.

Rekreacyjne przyjmowanie substancji psychoaktywnych to poważny problem zdrowotny i społeczny, a choć niewątpliwie jest problemem palącym, pozostaje nadal nierozwiązany z uwagi na nieustanne pojawianie się nowych substancji psychoaktywnych (NPS), nazywanych także „dopalaczami” (w jęz. polskim) czy „designer drugs” (w jęz. angielskim). Wprawdzie wiele z NPS



to substancje będące modyfikacjami chemicznymi związków znanych już wcześniej i zsyntetyzowanych wiele lat temu, jednak nowe pochodne wykazują często działanie mocniejsze lub inne niż znane dotychczas. Zaliczane do NPS, syntetyczne katynony mają strukturę chemiczną podobną do klasycznych związków psychostymulujących i analogicznie, ich pierwotny mechanizm farmakologicznego działania polega na podwyższaniu poziomów monoamin w szczelinie synaptycznej i nasileniu stymulowanego tymi monaminami przekazywania nerwowego w mózgu. Zainteresowanie rekreacyjnym używaniem katynonów, szczególnie wśród osób młodych i będących w okresie rozrodczym i związane z tym duże ryzyko poważnych zatruć prowadzących do sytuacji zagrożenia życia, jak też możliwość efektów teratogennych, dobrze uzasadnia podjęcie przez Doktorantkę badań nad efektami wywoływanymi przez stosunkowo mało przebadany syntetyczny katynon, MDPV. Zatem wybór tematu rozprawy jest dobrze uzasadniony, a wyniki badań zawarte w recenzowanej pracy dostarczają nowych informacji i mogą znaleźć zastosowanie przy szacowaniu ryzyka zażywania syntetycznych katynonów przez kobiety w ciąży.

Formalny opis rozprawy

Rozprawa licząca 146 stron ma układ typowy dla rozpraw doktorskich i zawiera 8 głównych rozdziałów (Wstęp, Cel pracy, Materiały i metody, Wyniki, Dyskusja, Wnioski oraz Streszczenia pracy w jęz. polskim i angielskim). Rozprawę rozpoczyna Spis treści oraz Wykaz skrótów. Liczący 32 strony Wstęp, zawiera 3 główne podrozdziały i szereg mniejszych podrozdziałów, wprowadzających czytelnika w zakres badań opisanych w rozprawie. Po Wstępie, jako osobny rozdział Doktorantka zamieściła cel rozprawy, a następnie opis materiałów i metod, zawierający 7 mniejszych podrozdziałów i obejmujący 21 stron. Wyniki, liczące 38 stron podzielone zostały na 7 głównych podrozdziałów. Następująca po tym rozdziale Dyskusja obejmująca 10 stron omawia najważniejsze problemy naukowe rozprawy. Rozprawa doktorska mgr Katarzyny Kuczyńskiej kończy się syntetycznymi ośmioma wnioskami, streszczeniami w dwóch wersjach językowych, rozdziałem obejmującym piśmiennictwo (ponad 180 pozycji) oraz spisami tabel i rycin. Załączony został także wykaz całkowitego dorobku naukowego Doktorantki na który składa się 11 publikacji, jeden rozdział w książce i pięć komunikatów zjazdowych, co stanowi znaczny dorobek na tym etapie kariery zawodowej. Załączono także oświadczenie współautorów o wkładzie ich pracy w powstanie jednej z tych publikacji zawierającej część wyników będących podstawą rozprawy. Udział Doktorantki w powstaniu tej publikacji był przeważający, został oszacowany na 65%.



Ocena merytoryczna

Wstęp ocenianej rozprawy jest napisany w sposób przystępny i interesujący, równocześnie omówione w nim zostały wszystkie zagadnienia konieczne dla zrozumienia zarówno celów rozprawy jak i uzyskanych wyników. W pierwszym podrozdziale Autorka podaje definicje pojęcia nowych substancji psychoaktywnych (NPS), omawia ich rozpowszechnienie, klasyfikację i status prawny. W Polsce, NPS znane jako „dopalacze”, pojawiły się około 20 lat temu jako tania i legalna alternatywa dla narkotyków objętych międzynarodową kontrolą. Mniej więcej w tym samym czasie zostało wprowadzone przez Unię Europejską określenie NPS precyzujące charakter tych substancji. Tym niemniej, konsument najczęściej nie wie co faktycznie jest mu sprzedawane, gdyż panująca celowa dowolność w opisach sprzedawanych NPS, może rodzić przekonanie o ich nieszkodliwości. Wśród NPS wyróżnia się cztery główne kategorie, z których jedna to związki psychostymulujące, obejmujące także katynony. Drugi podrozdział, zatytułowany „*Syntetyczne katynony*”, dostarcza czytelnikowi informacji na temat pochodzenia syntetycznych katynonów, które są analogami katynonu – związku występującego naturalnie w liściach i pąkach krzewu czuwaliczki jadalnej zwanej potocznie katem. Doktorantka w sposób interesujący opisała historię badań nad syntetycznymi katynonami, budowę i mechanizm ich działania ze szczególnym uwzględnieniem MDPV. Wiele z otrzymanych pochodnych katynonu badano pod kątem ich zastosowania w leczeniu, jednak nie weszły one do leczenia poza jednym wyjątkiem, leku nazwanego bupropion, i stosowanego m.in. w leczeniu depresji. Badany w rozprawie doktorskiej, MDPV, jest silnym inhibitorem wychwytu zwrotnego katecholamin, przy czym wykazuje wysoką selektywność względem transportera dopaminowego (DAT), a umiarkowane powinowactwo do transportera noradrenaliny (NET). Natomiast nie wywiera wpływu na przekaźnictwo serotoninowe. W dalszych częściach tego podrozdziału omówiono własności fizykochemiczne MDPV i jego metabolizm, a następnie efekty działania MDPV w modelach zwierzęcych. MDPV posiada właściwości uzależniające, wykazane w badaniach behawioralnych na modelach zwierzęcych. Kolejne części podrozdziału dotyczą efektów działania syntetycznych katynonów u ludzi, a następne poruszają zagadnienia neurotoksyczności *in vivo* i *in vitro* syntetycznych katynonów w porównaniu do klasycznych związków psychostymulujących. Dane kliniczne pokazują że zażywanie MDPV jest powiązane z wysokim ryzykiem zagrażających życiu powikłań zdrowotnych. Listę najważniejszych działań niepożądanych syntetycznych katynonów przedstawiono w postaci tabeli (Tabela I), wśród nich przeważają objawy ze strony układu nerwowego i sercowo-naczyniowego. Pomimo szerokiego rozpowszechnienia syntetycznych katynonów i przypadków wystąpienia efektów toksycznych ze strony ośrodkowego układu nerwowego okazuje się, że niewiele wiadomo na temat



neurotoksyczności syntetycznych katynonów *in vivo*. Podczas gdy u dorosłych osobników podawanie katynonów może wywołać upośledzenie funkcji kognitywnych oraz pamięci roboczej i epizodycznej, to jedynie w niewielkim stopniu poznane są długotrwałe następstwa ekspozycji na syntetyczne katynony w okresie wczesnego rozwoju ośrodkowego układu nerwowego. Rozprawa doktorska mgr Katarzyny Kuczyńskiej wypełniła więc częściowo tę lukę.

Ostatnia część Wstępu dotyczy zagadnienia roli hipokampa w procesach pamięciowych. Doktorantka, w sposób przystępny i wystarczająco szczegółowy przedstawiła tutaj rodzaje pamięci oraz omówiła rolę formacji hipokampa, struktur korowych i ośrodków podkorowych funkcjonalnie powiązanych z hipokampem w procesach pamięciowych. Wprawdzie kodowanie informacji, ich konsolidacja i przywoływanie z pamięci zależy od wielu wzajemnie połączonych ze sobą obszarów mózgu, to jednak hipokamp pełni w nich kluczowe funkcje. Wstęp zamyka podrozdział opisujący fenomen neuroplastyczności – neurogenezę i synaptogenezę w hipokampie. Rozdział Wstępu został także zilustrowany czterema rycinami, obrazującymi kolejno: ogólny wzór strukturalny pochodnych katynonu z uwzględnieniem możliwej lokalizacji podstawników; wzory strukturalne neuroprzekazników monoaminergicznych, klasycznych związków psychostymulujących oraz związków należących do grupy katynonów; rodzaje pamięci i kontrolujące je struktury mózgowe oraz budowę hipokampa myszy.

W mojej opinii lektura rozdziału *Wstępu* bardzo dobrze wprowadza czytelnika w zagadnienia opisywane w dalszych częściach rozprawy doktorskiej, zawiera wszystkie informacje istotne dla zrozumienia pracy i świadczy o rozległej wiedzy Autorki. Mam tutaj tylko drobne uwagi, które z obowiązku recenzenta przedstawiam:

1. Na str. 21 przytoczono dane wskazujące na zależne od płci różnice w biodostępności po podaniu dootrzewnowym racemicznej formy MDPV u szczurów, gdzie obserwowano wyższą biodostępność związku u samców. Mam pytanie czy analogiczne różnice w biodostępności MDPV występują także u myszy, które stanowiły model zwierzęcy w badaniach w niniejszej pracy ? czy istnieją dane na ten temat?
2. Str. 22, podtytuł nr 1.2.3. jest „MDVP”, przestawienie liter, powinno być „MDPV”
3. Str. 34, termin „komórki piramidalne” proponowałabym jednak zastąpić określeniem „komórki piramidowe”.

Cel rozprawy, został jasno sprecyzowany i zamieszczony jako osobny rozdział. Praca miała na celu ocenę wpływu MDPV, podawanego myszom w okresie pomiędzy 11 a 20 dniem po urodzeniu, na rozwój i funkcje hipokampa oraz procesy poznawcze i pamięć zwierząt po



osiągnięciu dorosłości. Taki wybór okresu podawania MDPV odpowiadał okresowi kluczowemu dla rozwoju hipokampa.

Materiały i metody – stanowią obszerny rozdział zawierający opisy użytego modelu badawczego, materiałów i wszystkich zastosowanych metod. Eksperymenty przeprowadzono na samcach i samicach myszy szczepu wsobnego C57BL/6J, które pochodziły z hodowli własnej założonej z par zarodowych zakupionych od certyfikowanego dostawcy – firmy Charles River. Warunki bytowania myszy oraz wykonywane procedury były zgodne z wymaganymi standardami, to jest odpowiednimi wytycznymi Unii Europejskiej, wytycznymi ARRIVE i zostały zatwierdzone przez Lokalną Komisję Etyczną. MDPV podawano podskórnie w dwóch dawkach 10 mg/kg lub 20 mg/kg, 1 x dziennie, w okresie od PD11 – PD20. Ten wiek koresponduje z III trymestrem ludzkiej ciąży, który jest okresem krytycznym dla rozwoju hipokampa.

Cel swojej rozprawy doktorskiej mgr Katarzyna Kuczyńska zrealizowała przeprowadzając szereg starannie i prawidłowo zaplanowanych i konsekwentnie wykonanych doświadczeń, w których stosowała standardowe testy behawioralne oceniające pamięć i zdolności poznawcze oraz wybrane techniki współczesnej biologii molekularnej i komórkowej. Wykorzystywane testy behawioralne obejmowały test spontanicznej alternacji – dla oceny wpływu MDPV na roboczą pamięć przestrzenną, test rozpoznawania nowego obiektu zastosowany do oceny wpływu MDPV na pamięć myszy związaną z funkcjonowaniem kory około-węchowej powiązanej z hipokampem oraz test labiryntu wodnego Morrisa, który posłużył do oceny zdolności uczenia się i pamięci przestrzennej zależnej od hipokampa. Neurogeneza w hipokampie była badana przy użyciu metod immunohistochemicznych, oceniających kolokalizację BrdU z markerami komórek układu nerwowego i z zastosowaniem analizy metodą mikroskopii konfokalnej. Ocena ekspresji białek związanych z neurogenezą i neuroplastycznością hipokampa – synaptofizyny (SYP) i białka gęstości postsynaptycznej (PSD95), była wykonana metodą Western blot. Uzyskane dane poddano wnikliwym analizom statystycznym. W mojej opinii rozdział ten został napisany w sposób systematyczny i wystarczająco dokładny, aby wykazać bardzo dobre opanowanie przez Doktorantkę zróżnicowanego warsztatu metodycznego. W czterech podrozdziałach zestawiono użyte odczynniki i związki chemiczne oraz przeciwciała. Ponadto Autorka załączyła rycinę ze schematem przedstawiającym kolejność przeprowadzonych procedur i doświadczeń na zwierzętach, co zdecydowanie pomaga czytelnikowi w śledzeniu przebiegu całości projektu. Zastosowane procedury wymagały dużego nakładu pracy ze względu na stopień skomplikowania i czasochłonność. Nie mam krytycznych uwag do tego rozdziału. Recenzowaną pracę oceniam wysoko pod względem metodycznym.



Wyniki stanowią najobszerniejszy rozdział rozprawy. Uzyskane wyniki przedstawiono na 38 rycinach, z których część stanowią zdjęcia z analizy ekspresji białek metodą Western blot i zdjęcia z mikroskopu konfokalnego. Ryciny cechuje przejrzysta konstrukcja, są prawidłowo i wystarczająco szczegółowo opisane. W rozdziale zamieszczono także tabelę przedstawiającą śmiertelność zwierząt w wieku PD11-20 w zależności od płci i podanego związku. W przebiegu eksperymentu wprawdzie utracono pojedyncze osobniki, jednak MDPV w zastosowanej dawce 10 i 20 mg/kg nie zwiększał w istotny sposób śmiertelności myszy podczas etapu podawania związku. Z kolei analiza wpływu MDPV na masę ciała wykazała, że przyrost masy był istotnie spowalniany przez podania MDPV, w sposób niezależny od płci zwierząt. Taki efekt był oczekiwany ponieważ liczne dane z piśmiennictwa pokazują, że jest to typowe następstwo ekspozycji na klasyczne związki psychostymulujące i syntetyczne katynony.

W swojej rozprawie doktorskiej pani mgr Katarzyna Kuczyńska wykazała, że MDPV podany myszom w bliskim okresie postnatalnym powoduje zaburzenia roboczej pamięci przestrzennej oraz krótko- i długotrwałej pamięci rozpoznawczej u dorosłych zwierząt. Doktorantka pokazała równocześnie, że wrażliwość na szkodliwe działanie MDPV jest niezależna od płci, inaczej niż miało to miejsce w przypadku klasycznych związków psychostymulujących, gdzie zależność efektu od płci była wcześniej opisywana w literaturze przedmiotu. Zaburzenia roboczej pamięci przestrzennej zostały wykryte w teście spontanicznej alternacji i w tym przypadku wpływ MDPV był zbliżony z opisywanymi wcześniej efektami ekspozycji na inne syntetyczne katynony, np. mefedron, lub na klasyczne związki psychostymulujące. Pogorszenie krótkotrwałej pamięci rozpoznawczej u myszy, ocenianej przez Doktorantkę w teście rozpoznawania nowego obiektu, było wywołane przez obydwie zastosowane dawki MDPV (10 i 20 mg/kg), a ponadto MDPV podawane w dawce 10 mg/kg pogarszało również u myszy pamięć długotrwałą. Takie upośledzenie pamięci rozpoznawczej, na skutek ekspozycji na MDPV, korelowało z wcześniejszymi obserwacjami dotyczącymi klasycznych związków psychostymulujących i syntetycznych katynonów. Natomiast badania wykonane w ramach dysertacji nie wykazały upośledzenia zależnej od hipokampa nauki i pamięci przestrzennej oraz pamięci referencyjnej ocenianej przy użyciu testu labiryntu wodnego Morrisa. MDPV nie upośledzał także elastyczności kognitywnej myszy. Również negatywne wyniki obserwowano w analizach biochemicznych: podawanie MDPV nie zaburzało neurogenezy w zakręcie zębatym hipokampa myszy zachodzącej w okresie jego rozwoju (PD11-20). MDPV nie wydaje się powodować poważnych zaburzeń plastyczności synaptycznej, przynajmniej ocenianej na poziomie ekspresji presynaptycznego białka synaptofizyny i postsynaptycznego PSD95, w hipokampie dorosłych myszy.



Przeprowadzone w ocenianej rozprawie badania dostarczyły interesujących i nowych informacji o charakterze odkryć naukowych. Uzyskane wyniki pozwoliły pani mgr Katarzynie Kuczyńskiej na wyciągnięcie wniosku, że indukowane przez MDPV upośledzenie pamięci nie jest związane z zaburzeniami neuroplastyczności lub synaptogenezy hipokampa. Uważam, że wyniki zostały przedstawione w sposób klarowny i logicznie uporządkowany i nie budzą zastrzeżeń.

Mam tutaj pewne nieliczne uwagi:

- 1. str. 65, Ryc. 7 – patrząc na tę rycinę odnoszę wrażenie, że procent poprawnych alternacji u samic kontrolnych jest niższy niż w grupie kontrolnych samców i jest na poziomie zbliżonym do obserwowanego w grupach które otrzymały MDPV. Ten fakt wymaga komentarza.**
- 2. Ryc. 17 – 19, Ryc., 24 i inne przedstawiające negatywne wyniki należało opisać raczej jako „Brak zmian” zamiast umieszczenia w legendzie do rycin terminu sugerującego „Wpływ MDPV”.**
- 3. Skrót nazwy synaptofizyny „SYP” oraz „ACTB” (str. 99) zostały pominięte i nie umieszczone w wykazie skrótów.**

W rozdziale **Dyskusja** wszystkie wyniki zostały dogłębnie omówione, przedyskutowane na tle bogato i odpowiednio cytowanego piśmiennictwa i podsumowane w postaci wniosków końcowych. Sposób prowadzenia dyskusji rozprawy doktorskiej pokazuje, że mgr Katarzyna Kuczyńska posiada dużą wiedzę i zdolność krytycznego podejścia do własnych wyników i *Dyskusja* jest dobrze osadzona w uzyskanych danych. Wyniki mają nowatorski charakter i wnoszą do nauki istotne wartości.

Autorka wysunęła hipotezy, że: „Zaobserwowane zaburzenia pamięci roboczej mogą świadczyć o zmianach funkcjonowania PFC, a zaburzenia pamięci rozpoznawczej – PER.” I z tym wiąże się moje pytanie: Jaki rodzaj badań zaproponowałaby Doktorantka dla weryfikacji wysuniętych hipotez ?

Zamieszczone po *Dyskusji* i ujęte w osobnym rozdziale **Wnioski** wskazują wyraźnie, że cele rozprawy zostały osiągnięte. Zarówno przy czytaniu *Dyskusji* jak i całej dysertacji można zauważyć utrzymywanie przez Doktorantkę dyscypliny logicznej, stosowanej przy pisaniu rozprawy i logiczny ciąg zaplanowanych doświadczeń, co sprawiło, że czytanie tekstu dysertacji było dla mnie nie tylko obowiązkiem, ale także przyjemnością.

Ocena edytorskiej strony rozprawy: Oceniana rozprawa ma dopracowaną szatę graficzną i, co warto podkreślić, w całości jest opracowana bardzo starannie. Tekst rozprawy został napisany w sposób klarowny, i nie budzi zastrzeżeń pod względem poprawności językowej. Doktorantce udało się zdecydowanie uniknąć błędów edytorskich.



Wniosek końcowy

Podsumowując, rozprawę doktorską mgr farm. Katarzyny Kuczyńskiej oceniam bardzo pozytywnie. Przeprowadzone doświadczenia zostały starannie zaplanowane i wykonane. Rozprawa zawiera interesujące wyniki, które noszą cechy odkryć naukowych. Doktorantka wykazała się odpowiednią wiedzą i umiejętnością prowadzenia badań naukowych. Poprawny styl i logiczny układ dysertacji, odpowiednio cytowana literatura, sposób przedstawienia i omówienia wyników wskazują na dobre opanowanie przez Doktorantkę warsztatu pracy naukowej. Przytoczone powyżej nieliczne niedopatrzenia edytorskie nie mają wpływu na wartość naukową ocenianej rozprawy i nie umniejszają mojej bardzo dobrej oceny. Ponadto część wyników stanowiących podstawę rozprawy została już opublikowana w postaci pracy, która ukazała się w *Pharmacological Reports* (2024) oraz w formie 3 komunikatów zjazdowych prezentowanych na międzynarodowych konferencjach naukowych, w których Doktorantka jest pierwszym autorem i autorem prezentującym.

W podsumowaniu stwierdzam, że rozprawa doktorska pt. „Ocena neurotoksyczności MDPV (3,4-metylenodioksyfawaleronu) podawanego w okresie rozwoju ośrodkowego układu nerwowego u myszy” autorstwa mgr 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. z 2018 r. poz. 1668 ze zm.). W związku z powyższym wnoszę do Rady Nauk Farmaceutycznych Uniwersytetu Medycznego w Łodzi o dopuszczenie mgr Katarzyny Kuczyńskiej do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora.

Wniosek o wyróżnienie pracy doktorskiej

W związku z moją wysoce pozytywną oceną i mając na uwadze oryginalny charakter badań oraz wysoką wartość naukową rozprawy, której wyniki zostały już częściowo opublikowane w czasopiśmie naukowym, wnoszę do Rady Nauk Farmaceutycznych Uniwersytetu Medycznego w Łodzi o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr Katarzyny Kuczyńskiej.

Prof. dr hab. Irena Nalepa