

UNIwersytet Medyczny w Lublinie

Wydział Farmaceutyczny

Katedra i Zakład Farmakologii z Farmakodynamiką

ul. Chodźki 4A (Collegium Pharmaceuticum), 20-093 Lublin

tel. (081) 448 7250,



Recenzja rozprawy doktorskiej

mgr farm. Katarzyny Alicji Kuczyńskiej

pt.: „Ocena neurotoksyczności MDPV (3,4-metylenodioksypirowaleronu) podawanego w okresie rozwoju ośrodkowego układu nerwowego u myszy”

wykonanej w Zakładzie Farmakodynamiki, Katedra Biofarmacji,
Wydział Farmaceutyczny, Uniwersytet Medyczny w Łodzi

Promotor: **dr hab. n. farm. Jakub Wojcieszak**

Tematyka rozprawy i uzasadnienie podjęcia tematu badań

Zgodnie z raportem Głównego Inspektoratu Sanitarnego, w samym tylko roku 2023 odnotowano 1698 przypadków zatruc związanych z dopalaczami, czyli nowymi substancjami psychoaktywnymi (NSP). Dopalmce działają podobnie do tradycyjnych narkotyków, ale mogą wywoływać szeroki zakres niebezpiecznych działań niepożądanych. Należą do nich zarówno naturalne, jak i syntetyczne związki chemiczne, które mają działanie euforyzujące, stymulujące lub halucynogenne. Problem ten dotyczy całego świata, a NSP, szczególnie popularne wśród młodzieży, mogą powodować poważne zaburzenia psychiczne.

Jedną z częściej nadużywanych substancji należących do grupy NSP jest syntetyczna pochodna katynonu, 3,4-metylenodioksypirowaleron (MDPV), który ma działanie podobne do amfetaminy czy MDMA. MDPV jest stymulującą substancją psychoaktywną, której nadużywanie prowadzi do poważnych skutków zdrowotnych, takich jak problemy sercowo-naczyniowe czy problemy neurologiczne. Ale dopalmce to również czynniki teratogenne i zazywanie ich w czasie ciąży może powodować nieodwracalne uszkodzenia płodu.

Tematyka pracy doktorskiej mgr farm. Katarzyny Alicji Kuczyńskiej doskonale wpisuje się w ten obszar badań. Jej głównym celem była ocena wpływu MDPV, podawanego w okresie pourodzeniowym u myszy (ekwiwalent III trymestru ciąży u kobiet) na rozwój hipokampa i procesy kognitywne u osobników dorosłych. Tematyka pracy jest innowacyjna i poznawczo interesująca.

Układ pracy, struktura podziału treści i poruszane zagadnienia

Praca doktorska **mgr farm. Katarzyny Alicji Kuczyńskiej** jest pracą pisemną o charakterze monografii naukowej, chociaż część wyników opublikowano już w pracy oryginalnej (Pharmacol Rep., 2024). Analizowana rozprawa ma układ klasyczny, liczy 140 stron maszynopisu, na które składają się główny tekst, 44 ryciny oraz 2 tabele. Na początku pracy umieszczono spis treści i wykaz stosowanych skrótów. Następnie monografia została podzielona na osiem rozdziałów. Pierwszy to Wstęp, po którym następują Cel pracy, Materiały i metody, Wyniki, Dyskusja, Wnioski, Streszczenie w języku polskim oraz Streszczenie w języku angielskim. Na końcu pracy dołączono Piśmiennictwo użyte do napisania monografii, dorobek oraz osiągnięcia naukowe Doktorantki.

W rozdziale **Wstęp** Doktorantka uzasadnia wybór tematu badawczego, zaczynając od omówienia NSP i ich nadużywania w Europie, szczególnie wśród młodych ludzi. Następnie charakteryzuje syntetyczne katynony, ich klasyfikację oraz mechanizm działania zależny od struktury chemicznej. Tutaj Doktorantka omawia grupę pirowaleronów, w tym MDPV, który był przedmiotem jej badań. Autorka opisuje właściwości fizykochemiczne MDPV, dawkowanie, sposoby przyjmowania, metabolizm oraz jego działanie w modelach zwierzęcych. Przedstawione zostały także zagrożenia zdrowotne związane z używaniem katynonów, szczególnie w przypadku przedawkowania MDPV u ludzi.

W dalszej części Wstępu Doktorantka szczegółowo omawia procesy uczenia się i pamięci, rodzaje pamięci oraz kontrolujące je struktury mózgu. Szczegółowa analiza obejmuje rolę hipokampa oraz struktur funkcjonalnie z nim powiązanych w mechanizmach pamięci. Ważnym elementem tej części wprowadzenia są dane dotyczące roli hipokampa w procesach neurogenezy i synaptogenezy oraz znaczenia wieku w tych procesach.

Podsumowując tę część pracy należy podkreślić, że Doktorantka porusza się swobodnie w tematyce badań, wykazując gruntowną znajomość i zrozumienie literatury z tego obszaru. Część literaturowa dowodzi również dojrzałości naukowej Doktorantki, objawiającej się m.in. umiejętnością syntetycznego przedstawienia wyników badań pochodzących z różnych źródeł. Warto również zwrócić uwagę, że większość cytowanych prac to publikacje z ostatnich lat, co świadczy o przemyślanym i celowym wyborze literatury przez Doktorantkę. Pod względem merytorycznym wprowadzenie doskonale współgra z celem pracy, co świadczy o bardzo dobrym przygotowaniu Doktorantki do realizacji podjętego zadania badawczego.

Cel pracy

Głównym celem dysertacji doktorskiej mgr farm. Katarzyny Alicji Kuczyńskiej była ocena wpływu MDPV, podawanego myszom w okresie pourodzeniowym (ekwiwalent III trymestru ludzkiej ciąży), na: a) rozwój i funkcje hipokampa oraz b) procesy poznawcze i

pamięć zwierząt po osiągnięciu dorosłości. Ponadto, w ramach prowadzonych badań próbowano wykazać, czy zmiany wywołane przez MDPV są zależne od płci. Cele rozprawy, a także realizowane zadania badawcze uważam za ważne i aktualne.

Metodyka badań

W kolejnym rozdziale zatytułowanym **Materiały i metody**, znajduje się opis eksperymentów prowadzonych przez Doktorantkę. Badania zostały logicznie zaplanowane i wykonane w sposób kompleksowy. Przeprowadzono eksperymenty z zakresu biologii molekularnej (Western blot - ocena ekspresji białek synaptofizyny (SYP) oraz białka gęstości synaptycznej (PSD95)), badania immunohistochemiczne (ocena liczby powstałych komórek z kolokalizacją BrdU z NeuN (neurony) czy z kolokalizacją BrdU z GRAP (astrocyty)) i behawioralne. W testach behawioralnych (test spontanicznej alteracji, test rozpoznawania nowego obiektu czy test labiryntu wodnego Morrisa -MWM) użyto dorosłych myszy (samce, samice), które otrzymywały MDPV w okresie wczesno-pourodzeniowym (PND11-20). Wybrane testy pozwoliły na kompleksowe przebadanie zaburzeń różnych typów pamięci, tj. roboczej, deklaratywnej (rozpoznawczej) oraz przestrzennej.

Pod względem doboru modeli doświadczalnych i realizacji badań część praktyczna rozprawy nie budzi zastrzeżeń; opisy są precyzyjne, umożliwiające czytelnikowi na powtórzenie eksperymentów. Zwraca uwagę różnorodny warsztat badawczy Doktorantki. Wysoko oceniam poziom merytoryczny badań przeprowadzonych przez Doktorantkę, biegłość w posługiwaniu się wieloma metodami eksperymentalnymi, skrupulatność w analizowaniu wyników badań oraz dociekliwość w ich interpretacji. Co więcej, wyniki przedstawione przez Doktorantkę mają wartość poznawczą i potencjalny walor edukacyjny dla przyszłych matek nadużywających dopalaczy.

Wyniki badań, Dyskusja i Wnioski

Z dużym zainteresowaniem przeczytałam analizę wyników, w której Doktorantka szczegółowo omawia efekty eksperymentów behawioralnych i molekularnych. Ogólne wnioski przedstawione przez Doktorantkę wskazują, że MDPV ma negatywny wpływ na funkcjonowanie pamięci roboczej oraz rozpoznawczej pamięci krótkotrwałej i długotrwałej u dorosłych myszy, które były poddane działaniu MDPV w okresie pourodzeniowym (PND11-20). Z drugiej strony, Doktorantka nie stwierdziła zmian w procesie uczenia się i pamięci przestrzennej ani elastyczności pamięci u tych zwierząt. Wyniki te korelują z danymi, które wykazały, że MDPV nie wpływa negatywnie na procesy neurogenezy w zakręcie zębatym hipokampa (DG), ani na plastyczność synaptyczną w tym regionie. Co więcej, obserwowane efekty MDPV nie były zależne od płci. Myślę, że dane te będą bardzo pomocne i ułatwią wybór odpowiednich badań/testów uzupełniających w celu wyjaśnienia mechanizmu prowadzącego do rozbieżności w destrukcyjnym wpływie MDPV na różne rodzaje pamięci, nie tylko w zespole Pana prof. Wojcieszaka ale również przez innych badawczy.

W części Dyskusja Doktorantka wykazała się bardzo dobrą znajomością tematu badawczego, właściwie opisała i przedyskutowała uzyskane wyniki konfrontując je z prawidłowo dobranymi pozycjami piśmiennictwa. Dyskusja przeprowadzona została poprawnie i wielokierunkowo, a Doktorantka zwraca uwagę na konieczność wykonania kolejnych badań w celu wyjaśniania niektórych kontrowersji dotyczących wpływu MDPV na patogenezę zaburzeń pamięci i uczenia. Szczególne uznanie budzi fakt, że Doktorantka omawia wszystkie istotne wyniki swoich badań, a także te które wskazują, że MDPV podany we

wczesnych okresie życia (III trymestr ciąży), nie działa tak samo destrukcyjnie na wszystkie typy pamięci (struktury mózgu?) mierzone u osobników dorosłych. Szukając przyczyny rozbieżności pomiędzy uzyskanymi wynikami a publikacjami innych autorów Doktorantka rozważa udział różnych czynników, równocześnie wskazując potrzebę rozszerzenia obecnych badań w celu rozwiązania tego problemu.

Podsumowując tą część pracy należy stwierdzić, że Doktorantka wnikliwie analizuje wyniki oraz szczegółowo uzasadnienia przyjęte w pracy rozwiązania. Dyskusja została przeprowadzona formalnie poprawie i uwzględnia wszystkie ważniejsze wątki.

Po zakończeniu Dyskusji Doktorantka (rozdział szósty) sformułowała **Wnioski** (13), w których podsumowuje przeprowadzone badania oraz podkreśla ich znaczenia.

Następne rozdziały pracy to Streszczenie w języku polskim oraz Streszczenie w języku angielskim. Po nich umieszczone jest Piśmiennictwo, które obejmuje 18 stron maszynopisu, cytowane bardzo skrupulatnie z podaniem wszystkich danych bibliograficznych łącznie z cyfrowym identyfikatorem dokumentu (doi) czy adresem URL artykułu. Cytowane artykuły są ściśle związane z tematem pracy doktorskiej. Większość pozycji została opublikowana po 2000 roku. Świadczy to o systematycznym śledzeniu przez Doktorantkę informacji dotyczących tematu pracy doktorskiej.

Mam kilka pytań do Doktorantki, które nasunęły mi się w czasie czytania pracy:

1. Proszę wyjaśnić procedury statystyczne, które Pani użyła przy ocenie wyników zamieszczonych na Ryc. 10, 11, 12 (i innych). Czy nie lepiej byłoby zastosować w ocenie statystycznej trójczynnikową analizę wariancji (three-way ANOVA)?
2. Proszę także o krótki komentarz, dlaczego przy ocenie zachowania zwierząt w testach pamięci nie wykonano dodatkowo pomiaru aktywności motorycznej czy oceny objawów lękowych, które mogły mieć wpływ na uzyskane wyniki? Czy w teście MWM zwierzęta mają zaburzenia motywacji czy, być może, zaburzenia aktywności lokomotorycznej wywołane podaniem wysokiej dawki MDPV w okresie pourodzeniowym?
3. W obecnej pracy MDPV był podawany nowonarodzonym myszom tylko w wyselekcjonowanym okresie pourodzeniowym, tj. PND11-20. Na jakiej podstawie wybrano ten okres do badań? Czy okres ten był wybrany zgodnie z publikacją Morford i wsp., 2002 (badania u szczurów)? Chciałabym zapytać czy Doktorantka próbowała podawać ten związek w czasie pierwszych dni życia (PND1-10) albo przez cały ekwiwalent III trymestru ciąży ludzkiej (PND1-21). Ciekawa jestem czy okres podania MDPV miał wpływ na wyniki badań dotyczące zaburzeń pamięci, tak jak to ma miejsce w przypadku MDMA u szczurów (Broening i wsp., 2001). Jeśli takie badania nie były przeprowadzone to może warto je przeprowadzić?

Praca napisana jest poprawnym językiem polskim, z dbałością o szczegóły. Drobne niedociągnięcia nie mają wpływu na wartość pracy. Mam tylko jedno pytanie: czy kolokalizacja dwóch słów „Efekt(y) działania...” w tytule Rozdziału 1.2.5 czy 1.2.6 ...” jest prawidłowa?

Wniosek końcowy

Podsumowując, wybór tematu rozprawy doktorskiej **mgr farm. Katarzyny Alicji Kuczyńskiej** uważam za w pełni uzasadniony, gdyż dotyczy istotnego problemu społecznego jakim są ryzyko nadużywania dopalaczy przez kobiety w ciąży. Założone cele zostały zrealizowane, a uzyskane wyniki są oryginalne, mają duże znaczenie poznawcze i stanowią istotny wkład w badania nad wpływem dopalaczy na rozwijający się mózg. W mojej ocenie, merytoryczna strona rozprawy nie budzi wątpliwości. Na uwagę zasługują prawidłowo zaplanowane i wykonane badania. Doktorantka wykazała się bardzo dobrą znajomością warsztatu badawczego. Przeprowadzone badania wskazują na doskonale manualne przygotowanie Doktorantki, umiejętność organizowania pracy badawczej, a także planowania i rozwiązywania zagadnień naukowych. W mojej opinii Doktorantka jest przygotowana do samodzielnej pracy badawczej.

Biorąc powyższe pod uwagę, przedłożoną mi do oceny **pracę doktorską mgr farm. Katarzyny Alicji Kuczyńskiej oceniam pozytywnie**. Rozprawa spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (t.j. Dz.U. 2023, poz. 742). Wnoszę do Rady Nauk Farmaceutycznych Uniwersytetu Medycznego w Łodzi o dopuszczenie mgr farm. Katarzyny Alicji Kuczyńskiej do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora.

Jednocześnie, biorąc pod uwagę nowatorski charakter badań, ich potencjał poznawczy oraz fakt opublikowania części badań w postaci oryginalnej pracy w czasopiśmie z listy JCR, wnoszę do Rady Nauk Farmaceutycznych Uniwersytetu Medycznego w Łodzi o nadanie Pani mgr farm. Katarzynie Alicji Kuczyńskiej stopnia naukowego doktora **z wyróżnieniem**.



Prof. dr hab. n. farm. Jolanta H. Kotlińska

Lublin, 20.09.2024