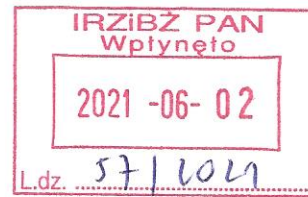


Jabłonna 21.05.2021 r.

dr hab. Anna Wójcik-Gładysz profesor instytutu
Zakład Fizjologii Zwierząt
Instytut Fizjologii i Żywienia Zwierząt
im. Jana Kielanowskiego PAN
05-110 Jabłonna
e-mail: a.wojcik@ifzz.pl



OCENA

**Rozprawy doktorskiej mgr Małgorzaty Domżańskiej
zatytułowanej:**

**Wpływ ostrego stanu zapalnego na aktywność β -glukuronidazy
oraz stężenie kwercetyny i jej metabolitów w splocie naczyńńwkowym,
krwi i płynie mózgowo-rdzeniowym**

Opis formalny rozprawy

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska Pani mgr **Małgorzaty Domżańskiej** wykonana została w Zakładzie Lokalnych Regulacji Fizjologicznych Instytutu Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności Polskiej Akademii Nauk w Olsztynie, pod kierunkiem promotora Pani prof. dr hab. n. wet. Janiny Skipor-Lahuta, oraz promotora pomocniczego dr Aleksandry Szczepkowskiej. Tematem prezentowanej pracy doktorskiej jest wyjaśnienie ewentualnego wpływu ostrego stanu zapalnego wywołanego podaniem liposacharydu (LPS) na aktywność β -glukuronidazy oraz stężenie kwercetyny i jej metabolitów w splocie naczyńńwkowym, krwi i płynie mózgowo-rdzeniowym.

W ostatnich latach obserwuje się zintensyfikowanie badań dotyczących interakcji zachodzących na poziomie ośrodkowego układu nerwowego (OUN) pomiędzy układami regulującymi kluczowe procesy konieczne dla prawidłowego funkcjonowania organizmu. Wiele badań dotyczy niezwykle istotnej kwestii współdziałania układu nerwowego i immunologicznego. Wszelkie zaburzenia w zrównoważonym współdziałaniu tych układów mogą prowadzić do poważnych schorzeń organizmu.

Z drugiej strony narastającym problemem staje się nasilenie chorób cywilizacyjnych, często spowodowanych nieodpowiednią dietą i narastające zjawisko antybiotykooporności, które może się stać w najbliższej przyszłości zagrożeniem globalnym. Wzrost liczby osób w podeszłym wieku, a co z tym związane wzrost odsetka osób dotkniętych chorobami neurodegeneracyjnymi jest ogromnym problemem społecznym, jak również ekonomicznym. Stąd przeciwdziałanie lub/i spowalnianie procesów neurodegeneracyjnych jest obecnie jednym z najważniejszych wyzwań współczesnej neurobiologii.

Przyczynia się to szczególnie w ostatnich latach do zwiększonego zainteresowania prozdrowotnymi właściwościami roślin i ich wtórnych metabolitów. Jedną z intensywnie badanych grup wtórnych metabolitów roślinnych są związki fenolowe, a głównie flawonoidy, charakteryzujące się silnymi właściwościami przeciwutleniającymi. Kwercyntyna, związek należący do grupy flawonoidów jest w ostatnich latach w centrum zainteresowania wielu badaczy ze względu na bardzo silne działanie antyoksydacyjne, przez co ma zdolność wspierania właściwości obronnych organizmu i chroni przed działaniem wolnych rodników tlenowych. Ponadto może być także potencjalnym związkiem zapobiegającym nowotworzeniu, ma zdolność wywoływania apoptozy komórek nowotworowych, jak i hamowania podziałów komórkowe. Właściwości przeciwzapalne kwercetyny mają dobroczynny wpływ na naczynia krwionośne, obniżają ciśnienie i chronią organizm przed powstawaniem miażdżycy, powodując że jest rozważana jako naturalny lek zapobiegający takim chorobom cywilizacyjnym jak udary i zawały

Jednym z najważniejszych warunków prozdrowotnego działania kwercetyny jest jej oczywiście jej biodostępność. Jako związek lipofilny jest raczej trudno rozpuszczalna w wodzie natomiast rozpuszcza się w tłuszczach a także w alkoholu. A zatem na zawartość kwercetyny w ludzkim organizmie wpływa przede wszystkim rodzaj pożywienia, dlatego warto włączyć do diety produkty o dużej jej zawartości. Związek ten występuje też w wielu roślinach od lat wykorzystywanych w medycynie ludowej jak: skrzyp polny, rumianek, gryka, dziurawiec, ruta, kasztanowiec, głąg czy czarny bez. Duże ilości kwercetyny znajdują się w herbacie, propolisie, miodzie oraz w czerwonym winie.

Na przestrzeni ostatnich kilku lat pojawiły się badania dotyczące neuroprotektoryjnego działania kwercetyny na poziomie OUN. Między innymi wykazuje ona działanie antyamyloidogenne, podnosi ilość acetylocholinę w neuronach cholinergicznym OUN, ponadto usprawnia funkcje motoryczne po urazach rdzenia kręgowego, zwiększa plastyczność synaps i spowalnia objawy choroby Alzheimera, wpływa też na funkcje poznawcze i się zdolność uczenia i zapamiętywania. Podsumowując, kwercyntyna może w przyszłości być wykorzystana w leczeniu wielu chorób neurodegeneracyjnych.

Kluczowe dla neuroprotektoryjnego działania kwercetyny jest jej stężenie w mózgu, a szczególnie od stężenia jej wolnej formy aglikonu kwercyntyna, wykazującego najsilniejsze właściwości przeciwutleniające. Jest ono regulowane najprawdopodobniej na poziomie barier mózgowia: bariery krew-mózg i bariery-krew płyn mózgowo-rdzeniowy, zlokalizowanej w nabłonku spłotu naczyńkowego (SN) komór mózgu. W płynie płyn mózgowo-rdzeniowym owiec, otrzymujących zawieszinę łusek cebuli, kwercyntyna w aż 88% występuje w postaci aglikonu Q i jej biologicznie aktywnej metylowanej pochodnej – iR, posiadającej zdolność dyfuzji przez błony komórkowe. W krwi natomiast kwercyntyna występuje głównie jako glukuronid - stabilna forma służąca do transportu z krwią do tkanek. Fakt ten świadczy o lokalnej dekonjugacji i uwolnieniu aglikonu który może przechodzić przez bariery mózgowia.

1. Charakterystyka rozprawy doktorskiej

Przedstawiona do oceny rozprawa to monografia stanowiąca zwarte opracowanie liczące 137 stron. Rozprawa napisana została zgodnie z ogólnie obowiązującym schematem opracowania rozpraw naukowych i zawiera następujące rozdziały: Wstęp (20 stron), Cel pracy (2 strony), Materiał i Metody (40 stron), Wyniki (23 stron), Dyskusja (12 stron), Podsumowanie (2 strony) i Wnioski (1 strona). Praca zawiera także objaśnienia użytych w pracy skrótów, oraz streszczenia w języku polskim i angielskim.

W prezentowanej dysertacji zamieszczono, 12 tabel i aż 42 rysunki (w tym sześć bardzo starannie wykonanych przejrzystych schematów odnoszących się do treści wstępu). Wstęp jest szczegółowo i bardzo dokładnie napisaną częścią pracy wprowadzającą czytelnika w tematykę prowadzonych badań, podzielony został na cztery rozdziały znacznie ułatwiające czytanie obszernego tekstu. W rozdziale tym Autorka zapoznała nas z dotychczasowym stanem wiedzy na temat budowy i roli flawonoidów, przedstawiła szczegółową charakterystykę badanej substancji czynnej, kwercynty oraz przedstawiła informacje dotyczące budowy i funkcjonowania barier mózgowia, czyli bariery krew-mózg oraz bariery krew-płyn-mózgowo-rdzeniowy.

W dalszej części pracy Autorka w jasny sposób przedstawiła Cel pracy i hipotezę badawczą. Postawiona hipoteza badawcza zakłada, że ostry stan zapalny: 1) zwiększa ekspresję β -glukuronidazy w splocie naczyniówkowym i jej aktywność w splocie naczyniówkowym i w płynie mózgowo-rdzeniowym; 2) wpływa na kumulację glukuronidu kwercynty w splocie naczyniówkowym oraz na stężenie kwercynty i jej metabolitów w płynie mózgowo-rdzeniowym.

Następnie Autorka przedstawiła logiczny sposób zweryfikowania przedstawionej hipotezy badawczej poprzez zaplanowanie szczegółowych zadań badawczych. Dotyczyły one na określenia wpływu stanu zapalnego na: 1) ekspresję genu kodującego β -glukuronidazę oraz aktywność β -glukuronidazy w splocie naczyniówkowym (*in vivo*) i w komórkach nabłonka spłotu naczyniówkowego (*in vitro*), 2) aktywność β -glukuronidazy w osoczu krwi, płynie mózgowo-rdzeniowym i w medium z hodowli komórek nabłonka spłotu naczyniówkowego, 3) kumulację glukuronidu w splocie naczyniówkowym i w komórkach nabłonka spłotu naczyniówkowego oraz 4) stężenie kwercynty i jej metabolitów w krwi i płynie mózgowo-rdzeniowym po podaniu dożylnym glukuronidu kwercynty.

Realizację zaplanowanych zadań badawczych umożliwiło pięć starannie zaplanowanych doświadczeń. Badania przeprowadzono w warunkach *in vivo* na modelu owcy z wykorzystaniem techniki cyklicznego pobierania płynu mózgowo-rdzeniowego oraz w warunkach *in vitro* na komórkach nabłonka spłotu naczyniówkowego szczura i linii komórek nabłonka spłotu naczyniówkowego człowieka.

Rozdział Materiały i Metody został przedstawiony bardzo szczegółowo, wskazując na znajomość licznych technik badawczych. Został opisany dokładnie, wyczerpująco i klarownie, w sposób zgodny z przyjętymi dla prac naukowych zasadami.

W rozdziale Wyniki oprócz opisu słownego uzyskane rezultaty zostały udokumentowane w postaci wykresów i zdjęć. Duża ilość wykorzystanych metod analitycznych i bogaty materiał doświadczalny zebrany zarówno w doświadczeniach *ex vivo* jak i *in vitro* pozwolił na uzyskanie wielu oryginalnych

i wartościowych wyników, które zostały przedstawione i opisane w sposób jasny i precyzyjny. Na uwagę zasługuje niezwykle staranne przygotowanie wykresów przedstawiających rezultaty poszczególnych doświadczeń. Wyniki te stanowią bogaty materiał źródłowy, o nowatorskim charakterze.

W obszernej i szczegółowej Dyskusji Doktorantka omówiła uzyskane w pracy wyniki na tle dotychczasowych danych w światowym piśmiennictwie. Autorka licznie cytuje najnowsze piśmiennictwo, a dyskusja jest przeprowadzona w sposób dowodzący znajomości literatury, świadczący o dogłębnym zapoznaniu się z prezentowanym zagadnieniem.

Pracę kończą rozdziały Podsumowanie i Wnioski, w którym zestawiono uzyskane przez Doktorantkę wyniki.

Ostatnią częścią pracy jest spis literatury zawierający 209 pozycji, jedna co rzadko spotykane jest z 1885 roku.

Przedstawiona praca doktorska wykonana została w ramach projektu Konsorcjum Naukowego KNOW „Zdrowe Zwierzę – Bezpieczna Żywność”. Autorka otrzymała stypendium finansowane ze środków dotacji KNOW Konsorcjum Naukowego „Zdrowe Zwierzę – Bezpieczna Żywność”, decyzja Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego nr 05-1/KNOW2/2015

2. Pytania i uwagi

Moim zdaniem, przedstawiona do oceny rozprawa doktorska wpisuje się w aktualne trendy badawcze dotyczące wyjaśnienia molekularnych podstaw interakcji układu nerwowego i immunologicznego. Dostrzeganie obok atutów także usterek czy mankamentów jest jednym z obligatoryjnych zadań recenzenta. Dlatego też, mimo iż generalnie pracę oceniam wysoko, muszę także wskazać na pewne uchybienia, aczkolwiek w przedstawionej pracy jest ich niewiele. Nie mają one również znaczenia mogącego obniżyć dużą wartość merytoryczną pracy. Część uwag ma charakter dyskusyjny, część to zapytania kierowane do Autorki pracy i wreszcie niektóre to drobne usterki stylistyczne i redakcyjne.

- Ponadnormatywna ilość skrótów szczególnie w Streszczeniu pracy wpływała na płynność narracji i utrudniała czasami percepcję tekstu. Może jednak ryzykując wydłużenie tekstu pracy można było z niektórych zrezygnować i używać pełnej nazwy badanych związków.
- Szkoda, że Autorka pracy nie pokusiła się o uporządkowanie obszernej (12 stron) i bardzo szczegółowej dyskusji poprzez podzielenie jej na części poświęcone najważniejszym problemom związanym z tematem pracy (podobnie jak uczyniła to we Wstępie). Przy tak dużej liczbie danych ułatwiłoby to czytanie tekstu. Oczywiście punkt widzenia Autora pracy może być odmienny niż mój, stąd też chętnie usłyszę komentarz.
- Jak wspomniałam Autorka bardzo dokładnie opisuje metodykę pracy, zabrakło mi jednak informacji na temat stanu fizjologicznego zwierząt. W pracy jest informacja „Badania zostały przeprowadzone na dorosłych samicach owiec rasy mieszanej (wiek: 3-7 lat, masa ciała (mc.): 50-

80 kg. Czy zwierzęta były poddane ovariectomii, czy może zastosowano synchronizację, czy też zwierzęta znajdowały się w okresie anestrus. Niejednorodność grupy mogła przyczynić się do większych różnic w uzyskanych wynikach np. "W badaniach zaobserwowano, że u owiec ze stanem zapalnym, stężenie Q3GA w osoczu krwi w 30. minucie od jego podania było wyższe (średnio 675 ± 458 nmol/L), niż u owiec kontrolnych (210 ± 180 nmol/L)" – bardzo duże odchylenia.

- W przedstawionej pracy badania przeprowadzono w warunkach *in vivo* na owcach oraz w warunkach *in vitro* na komórkach nabłonka spłotu naczyńkowego szczura. Czy rozważała Pani możliwość wykonania badań *in vitro* również na materiale pobranym od owcy.
- W pracy stwierdzono "Model owczy wybrano z uwagi na stabilność struktury czaszki umożliwiającą implantację kaniul do ośrodków w mózgu". Czy mogłaby Pani bliżej wyjaśnić to stwierdzenie
- W dokładnym wykazie skrótów zabrakło jednego z ważniejszych a mianowicie SN-splot naczyńkowy, pojawiła się też drobna niekonsekwencja w nazwie linia komórek brodawczaka nabłonka spłotu naczyńkowego człowieka.
- W części Wnioski stwierdzono "glukuronid Q kumuluje się na powierzchni komórek nabłonka SN, a ostry stan zapalny nie wpływa na jego kumulację" Czy mogłaby Pani wyjaśnić dokładniej ten wniosek.

3. Merytoryczne aspekty i atuty pracy

Dużym walorem pracy jest dojrzałe i szczegółowe podejście do rozwiązania podjętego tematu badawczego. Wyraża się ono między innymi wykorzystaniem w pracy zarówno trudnych technicznie i czasochłonnych doświadczeń *in vivo* na dużych zwierzętach jak i technik *in vitro*, między innymi hodowli komórek nabłonka spłotu naczyńkowego jak i zastosowaniem wielu nowoczesnych a zarazem pracochłonnych technik analitycznych. Do realizacji założonych badań doktorantka wykorzystwała metody testów MTT i LDH, pomiary metodą HPLC i kolorymetryczną, metody izolacji RNA i reakcji odwrotnej transkrypcji (RT-PCR), techniki immunohistochemiczne, co pozwoliło na maksymalne wykorzystanie materiału biologicznego pochodzącego zarówno z doświadczeń prowadzonych *in vivo* jak i *in vitro*. Tak duża ilość zastosowanych technik analitycznych i podjęty w pracy problem naukowy świadczą o szerokiej wiedzy Doktorantki zarówno w zakresie znajomości warsztatu metodycznego jak wiedzy z zakresu neurologii i immunologii. Uzyskane podczas realizacji pracy wyniki świadczą o tym, że w zrealizowano założone zadania badawcze mające na celu określenie wpływu ostrego stanu zapalnego wywołanego podaniem liposacharydu (LPS) na aktywność β -glukuronidazy oraz stężenie kwercetyny i jej metabolitów w splocie naczyńkowym, krwi i płynie mózgowo-rdzeniowym. Doktorantka ciekawie dyskutuje uzyskane rezultaty badań w świetle literatury naukowej zamieszczanej w renomowanych czasopismach, odnosząc się do badań prowadzonych w ośrodkach zagranicznych, jak również w rodzimym Instytucie.

4. Wnioski końcowe

Rozprawa doktorska Pani mgr **Małgorzaty Domżałskiej** stanowi istotną pozycję naukową w obszarze fizjologii z ukierunkowaniem na interakcje układów nerwowego i immunologicznego w ośrodkowym układzie nerwowym. Podjęta tematyka **wpisuje się w nowoczesne trendy badawcze**, a uzyskane rezultaty wzbogacają w sposób znaczący dotychczasową wiedzę. Przeprowadzenie prezentowanych badań wymagało zastosowania skomplikowanych i trudnych procedur doświadczalnych a także dużego nakładu pracy. Z pełnym przekonaniem stwierdzam, że przedstawiona do oceny praca doktorska prezentuje wysoki poziom naukowy, a Autorka wykazała się dobrym opanowaniem warsztatu badawczego i znajomością najnowszego piśmiennictwa z zakresu tematyki prowadzonych badań.

Przedstawiona mi do oceny rozprawa zatytułowana: „Wpływ ostrego stanu zapalnego na aktywność β -glukuronidazy oraz stężenie kwercetyny i jej metabolitów w splocie naczyniówkowym, krwi i płynie mózgowo-rdzeniowym” spełnia zatem wszystkie wymagania określone w Ustawie o Stopniach Naukowych i Tytule Naukowym oraz Stopniach i Tytule w Zakresie Sztuki z dnia 14.03. 2003 r. (Dz.U. z 2003 r., Nr 65, poz. 595, wraz z późniejszymi zmianami), jak również zapisy Ustawy z dnia 20 lipca 2018 roku (Dz.U. z 2018r. poz. 1668) stawiane rozprawom doktorskim i w związku z powyższym zwracam się do Rady Naukowej Instytutu Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności Polskiej Akademii Nauk w Olsztynie z prośbą o dopuszczenie Pani mgr Małgorzaty Domżałskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie, ze względu na bardzo wysoką wartość merytoryczną pracy i istotną myśl naukową w niej zawartą wnioskuję o wyróżnienie pracy.

Anna Wójcik - Gładysz

dr hab. Anna Wójcik-Gładysz