uken
INSTYTUT BIOLOGII I NAUK O ZIEMI

Uniwersytet Komisji
Edukacji Narodowej
w Krakowie

Dr hab. Agnieszka Greń, prof. UKEN
Katedra Fizjologii Zwierząt
Instytut Biologii i Nauk o Ziemi
Uniwersytet Komisji Edukacji Narodowej w Krakowie
e-mail: agnieszka.gren@uken.krakow.pl

Kraków, 2024.09.02

RECENZJA

rozprawy doktorskiej Pana mgr. Jana Rucińskiego pt.:
„Wpływ galaktooligosacharydów na behawior oraz wybrane obwodowe i ośrodkowe komponenty reakcji stresowej u szczurów w warunkach długotrwałej elektrycznej stymulacji jądra środkowego ciała migdałowatego"
wykonanej w Katedrze Fizjologii Zwierząt i Człowieka,
Wydziału Biologii Uniwersytetu Gdańskiego,
pod opieką naukową dr hab. Jolanty Orzeł-Gryglewskiej, prof. UG.
i promotora pomocniczego dr Doroty Myślińskiej.

Podstawa formalno-prawna

Ocenę Pracy doktorskiej Pana mgr. Jana Rucińskiego wykonałam w oparciu o pismo skierowane przez Przewodniczącą Rady Dyscypliny Nauki biologiczne Uniwersytetu Gdańskiego Panią dr hab. Joannę N. Izdebską, prof. UG, z dnia 18.07.2024, w którym, w imieniu Rady Dyscypliny Nauki biologiczne, zwraca się do mnie z prośbą o opracowanie recenzji w/w Rozprawy.

Ogólna charakterystyka Rozprawy i ocena merytoryczna

Coraz więcej wyników badań naukowych wskazuje na interakcję między mikrobiotą jelitową, jelitami i ośrodkowym układem nerwowym. Zależności te w literaturze są opisywane jako oś mikrobiom-jelita-mózg. Dysregulacja tej osi może mieć związek z zaburzeniami czynnościowymi jelit, w tym zespołem jelita drażliwego i zmianami w mikrobiocie jelitowej. Ponadto wykazano, że brak i/lub modyfikacja mikroflory jelitowej wpływa na reakcję osi podwzgórze-przysadka-nadnercza na stres i może prowadzić do zaburzeń neuropsychiatrycznych. Kwas gamma-aminomasłowy jest głównym neuroprzekaźnikiem hamującym OUN i jest znacząco zaangażowany w regulację wielu procesów fizjologicznych i psychologicznych. Zmiany w ekspresji ośrodkowego receptora GABA są powiązane z patogenezą lęku i depresji, które, jak twierdzi wielu naukowców, są współwystępujące z zaburzeniami czynnościowymi jelit. Czy suplementacja prebiotyków może łagodzić zmiany behawioralne, endokrynne, immunologiczne i neurochemiczne będące efektem nadaktywności struktur mózgowia np. ciała migdałowatego? Czy faktycznie prebiotyki, wykazują skuteczność terapeutyczną w stosunku do zmienionej w wyniku hiperaktywacji ciała migdałowatego mikrobioty jelitowej? Czy na pewno istnieje związek pomiędzy dysbiozą mikrobioty jelitowej i zaburzeniami neuropsychiatrycznymi? Próbę odpowiedzi na te i inne pytania podjął w swej pracy doktorskiej Pan mgr Jan Ruciński.

Rozprawa doktorska Pana mgr. Jana Rucińskiego została przygotowana w postaci klasycznej monografii naukowej, pięknie napisana w języku polskim. Rozprawa liczy 211 stron, jest podzielona na rozdziały - typowe dla tego rodzaju opracowań tj.: Oświadczenie o finansowaniu str. 3, Spis tabel str. 9-10, Spis rycin str. 10-12, Wykaz najważniejszych skrótów str. 13-15, Streszczenie str. 16-17, Abstract str. 18-19, Wstęp (w tym założenia, hipotezy badawcze i cele pracy) str. 20-62, Materiały i metody str. 63-81, Wyniki str. 82-155, Omówienie wyników i dyskusja str. 156-178, Podsumowanie i wnioski str. 179, Piśmiennictwo str. 180-198, Suplement str. 199-211.

Podjęty przez Doktoranta temat rozprawy doktorskiej jest bardzo ważny ze względów poznawczych jak i praktycznych, bo przecież poszerzenie wiedzy na temat wpływu nadaktywności ciała migdałowatego na wybrane markery hematologiczne, czynnościowe, immunologiczne i neurochemiczne organizmów, może przyczynić się do tworzenia nowych terapii zaburzeń neuropsychicznych. Ponadto, Autor wzbogacił swoje badania o analizę mikrobioty jelitowej, której przypisywana jest olbrzymia rola w utrzymaniu zdrowia i homeostazy całego organizmu. Klamrą spinającą powyższe tematyki badawcze stały się galaktooligosachrydy, prebiotyki suplementowane dla poprawy pracy jelit i ogólnego stanu układu pokarmowego, a Doktorant sprawdził ich potencjał terapeutyczny w leczeniu zaburzeń lękowych i depresji. Życzę Panu mgr. Janowi Rucińskiemu aby wyniki jego badań stały się inspiracją do ich kontynuowania, zgodnie z tym co napisał w akapicie kończącym rozdział Wstęp: „Potwierdzenie potencjału terapeutycznego galaktooligosacharydów w mojej pracy może zainicjować dalsze badania przedkliniczne i kliniczne, co pozwoli na wykorzystanie tych prebiotyków jako suplementacji uzupełniającej terapię pacjentów cierpiących na zaburzenia neuropsychiatryczne związane z lękiem i stresem".

Wstęp obejmuje 3 podrozdziały (plus 4. Założenia, hipotezy badawcze i cele pracy), które teoretycznie – w oparciu o studium literatury - wprowadzają czytelnika w zagadnienia związane z podjętą tematyką badawczą. W podrozdziale 1.1. czytelnik zapoznaje się z budową i funkcją ciała migdałowatego, ze szczególnym jego udziałem w reakcji stresowej. Autor opisał rodzaje stresu i stresorów oraz powiązał te wiadomości z fizjologiczną odpowiedzią na stres. W kontekście patofizjologii zaburzeń będących efektem stresu istotną funkcją ciała migdałowatego jest zaangażowanie w regulację aktywności osi podwzgórze-przysadka-nadnercza. Lezja jądra środkowego ciała migdałowatego łagodzi zachowania lękowe indukowane chronicznym stresem, a także osłabia aktywację osi PPN. Ponadto, biorąc pod uwagę doniesienia naukowe, można też stwierdzić, że ciało migdałowate odgrywa istotniejszą rolę w przypadku stresu przewlekłego niż w warunkach stresu ostrego. ***Proszę aby Doktorant podjął próbę wyjaśnienia mechanizmów powyższych różnic w roli Amg w różnych rodzajach stresu.***

Dużą część tego podrozdziału zajmuje opis tematyki dotyczącej patogenezy zaburzeń neuropsychiatrycznych w szczególności depresyjnych i lękowych. Stwierdzono, że nasilenie objawów ciężkich zaburzeń depresyjnych koreluje z ze wzrostem stężenia kortyzolu w ślinie i osoczu w porównaniu do stężeń tego hormonu u pacjentów z łagodniejszymi postaciami zaburzeń depresyjnych. Podobnie jak w przypadku depresji, u znacznego odsetka pacjentów z zespołem lęku uogólnionego oraz zespołem lęku napadowego dochodzi do nadreaktywności osi podwzgórze - przysadka - nadnercza i hiperkortyzolemii. Reaktywność osi PPN mogą

modulować systemy neurotransmisyjne związane np. z serotoniną, noradrenaliną czy kwasem gamma-aminomasłowym. Można przypuszczać, że na skutek stresu dochodzi do reorganizacji interneuronów i zaburzeń neurotransmisji GABA-ergicznej, szczególnie w korze przedczołowej, która pełni funkcje m.in. w regulacji procesów poznawczych, działaniu pamięci roboczej, planowaniu ruchów i działań, rozważania ich konsekwencji, odpowiedzi na stres, a także wpływa hamująco na spontaniczne i często gwałtowne stany emocjonalne, których źródłem jest podwzgórze i układ limbiczny. ***Dlaczego transmisja GABA-ergiczna jest tak ważna w odniesieniu do większości aspektów procesów zachodzących w mózgu?***

W konkluzji Doktorant stwierdził, że zaburzenia homeostazy organizmu w odpowiedzi na stres, w tym zmiany reaktywności osi podwzgórze-przysadka-nadnercza, odgrywają kluczową rolę w patogenezie zaburzeń neuropsychiatrycznych, takich jak depresja, zaburzenia lękowe, czy zespół stresu pourazowego, przez co mogą być cennym biomarkerem diagnostycznym oraz stanowić cel dla opracowania nowych metod terapeutycznych.

Na uwagę zasługuje fakt, że w tym podrozdziale Autor zwrócił uwagę na znaczący rozwój i unowocześnienie technik neuroobrazowych i elektrofizjologicznych (funkcjonalnego rezonansu magnetycznego, pozytonowej tomografii emisyjnej, elektroencefalografii, funkcjonalnej spektroskopii w bliskiej podczerwieni) służących lepszemu poznaniu anatomicznego i czynnościowego podłoża mechanizmów patofizjologicznych zaburzeń neuropsychiatrycznych, czyli lepszej diagnozie pacjentów. Oby zawsze po bardzo dobrej diagnostyce następowało prawidłowe leczenie.

Kolejno mgr Jan Ruciński opisuje związek pomiędzy stresem i układem odpornościowym, w kontekście zaburzeń neuropsychiatrycznych.

Następny podrozdział (1.2.) to spotkanie z mikrobiomem. Autor, przedstawił kilka definicji mikrobiomu i przede wszystkim scharakteryzował mikrobiom jelitowy, często tajemniczo określany jako „ukryty narząd", wpływający na procesy fizjologiczne organizmu, w którym bytuje. Oś mikrobiota-jelita-mózg zyskuje coraz większą popularność w badaniach analizujących biologiczne i fizjologiczne podstawy zaburzeń psychiatrycznych, neurorozwojowych, związanych z wiekiem i neurodegeneracyjnych. Stres może znacząco wpłynąć na oś mikrobiota-jelita-mózg na wszystkich etapach życia. Wyniki wielu prac badawczych wiążą dysbiozę mikrobioty jelitowej z wieloma schorzeniami, w tym autyzmem, zaburzeniami lękowymi, depresją, schizofrenią, chorobą Parkinsona, chorobą Alzheimera, otyłością.

Kolejny interesujący podrozdział (1.3.) dotyczy charakterystyki i potencjału terapeutycznego prebiotyków. Autor w przystępny i ciekawy dla czytelnika sposób opisał przykłady prebiotyków, ich naturalne i syntetyczne źródła oraz ich wpływ na mikroorganizmy.

Po przeczytaniu tej części wstępu nasuwa się pytanie: ***Czy doktorant zaleciłby codzienną suplementację prebiotyków, czy tylko w stanach chorobowych?***

Wstęp kończy podrozdział, w którym Doktorant przedstawił założenia i cel pracy oraz sformułował hipotezy badawcze. W dalszej kolejności w celu weryfikacji hipotez badawczych przedstawił oryginalne zadania badawcze.

Na podkreślenie zasługuje to, że każdy podrozdział zakończony jest klarownym podsumowaniem. Ponadto, Doktorant nie boi się konfrontować ze sobą często odmiennych wyników badań różnych autorów. O jego dojrzałości naukowej może świadczyć fakt, że krytycznie, z dużym zapleczem wiedzy merytorycznej, odnosi się do stanu wiedzy na podjęty temat. W licznych miejscach monografii pięknie opisuje jak zmieniała się wiedza na

intersujący Go temat. Zwracam również uwagę na czytelne opracowanie Wykazu najważniejszych skrótów używanych w tekście z poprawnymi tłumaczeniami polskimi, co z jednej strony znacznie ułatwia czytanie rozprawy doktorskiej, jednak z drugiej, w wielu miejscach dysertacji wydaje się, że zasadne byłoby stosowanie pełnych określeń, a nie skrótów np. *„Przewlekły stres i wysoki poziom GK prowadzą do wzrostu wytwarzania CRH w CeA, co skutkuje zwiększeniem ekspresji mRNA CRH w PVN i tym samym może wzmacniać wpływ Amg na stymulację osi PPN" (str. 24).*

W części metodycznej dysertacji mgr J. Ruciński przedstawia zwierzęta doświadczalne tj. 48 samców szczurów stada niekrewniaczego Wistar Han, które w wieku 3 miesięcy i początkowej średniej masie ciała 250±50 g zostały przywiezione do Zwierzętarni Katedry Fizjologii Zwierząt i Człowieka Wydziału Biologii Uniwersytetu Gdańskiego, gdzie były utrzymywane w warunkach LD 12:12, 60±10% wilgotności powietrza, przy średniej temperaturze w pomieszczeniu 21±1°C, z pełnym dostępem do wody i pożywienia. Przed rozpoczęciem procedur doświadczenia szczury przeszły miesięczny okres adaptacji do nowych warunków, w tym dwutygodniowy okres adaptacji do osoby eksperymentatora, wyjmowania z klatki oraz krótkotrwałego przytrzymywania w pozycji, którą wykorzystywano później podczas „przypinania" do aparatury stymulacyjnej. Następnie zwierzęta zostały podzielone na VI grup doświadczalnych po 8 osobników każda.

Ta część rozprawy jest bardzo szczegółowa, procedury/metody badań dokładnie opisane, co sugeruje praktyczne zaangażowanie Autora w wykonywanie żmudnych i wymagających doświadczenia metod badawczych. Wszystkie zastosowane metody są różnorodne, standardowo wykorzystywane w tego typu badaniach naukowych i nowoczesne. Sądzę, że po przeczytaniu wszystkich podrozdziałów tego rozdziału, wzbogaconych schematem procedur doświadczalnych, serią zdjęć szczurów stymulowanych w aktometrach, serią zdjęć etapów socjalnego testu trójkomorowego, bez problemu, mając podstawowe zdolności manualne, techniczne i wiedzę w tej tematyce, można powtórzyć całe doświadczenie. Na przeprowadzenie doświadczeń uzyskano zgodę Lokalnej Komisji Etycznej ds. Doświadczeń na Zwierzętach w Bydgoszczy.

Po przeczytaniu tego Rozdziału dysertacji nasunęły mi się kolejne pytania, na które proszę aby mgr J. Ruciński udzielił odpowiedzi:

1. ***Dlaczego w eksperymencie wykorzystano samce?*** *- w publikacjach zwraca się uwagę na różnice w reakcjach organizmów samic i samców, a tym samym w wynikach analizy różnych parametrów np. fizjologicznych chociażby na różne stresory, a w efekcie zaburzenia neuropsychiatryczne.*
2. ***Dlaczego Doktorant wybrał do swych badań właśnie taki model zwierzęcy?***
3. ***Dlaczego do badań porównawczych wybrano citalopram, a nie inny lek przeciwdepresyjny?***

Kolejny rozdział rozprawy doktorskiej – Wyniki, został podzielony na podrozdziały, które ułatwiają czytelnikowi zaznajomienie się z uzyskanymi wynikami badań. Rozdział ten jest bardzo szczegółowy, logiczny, klarowny, wskazujący na ogrom pracy, którą wykonał Doktorant. Wzbogacony jest licznymi, czytelnymi wykresami (36), tabelami (11), zdjęciami z programu EthVision XT 10 (3) oraz zdjęciem preparatów mikroskopowych, wybarwianych metodą Nissla skrawków mózgowia przykładowych szczurów stymulowanych. Wyniki zostały

poddane prawidłowej analizie statystycznej. Dodatkowo w rozdziale 7. Suplement, umieszczono 12 tabel, zawierających wyniki podstawowych statystyk opisowych: średnia, odchylenie standardowe, błąd standardowy średniej oraz wartości p testu Shapiro-Wilka. Stwierdzam, że krótkie podsumowania na zakończenie każdego podrozdziału, jak również podrozdział 3.9. Zestawienie głównych wyników uzyskanych w pracy i tabele 9, 10, 11 są dodatkowymi atutami pracy.

Po przeczytaniu tego rozdziału monografii doktorskiej uważam, że zamiast stosować zwrot 'poziom' (np. poziom adrenaliny, GABA, IL-10) powinno się stosować zwrot 'stężenie' (Autor stosuje wymiennie). Proszę Doktoranta o odpowiedź na poniższe pytania:

1. ***Czy zwracał Pan uwagę na rytmikę okołodobową wydzielania kortykosteronu?*** (o czym zresztą pisał we wstępie str. 23)
2. ***Jak zinterpretuje Pan uzyskane wyniki dotyczące gatunków bakterii wyhodowanych na podłożach BSM oraz krwawym, (ryc. 40, str. 144; ryc. 42, str.146) w mikrobiocie jelitowej szczurów poddanych długotrwałej stymulacji elektrycznej i przyjmujących wyłącznie wodę (Stim)?***

W rozdziale Omówienie wyników i Dyskusja, Autor z powodzeniem, dojrzałością i wnikliwością doświadczonego naukowca, omawia oraz interpretuje uzyskane wyniki badań własnych, odnosi je do hipotez badawczych i zestawia z wynikami badań innych autorów. Ta część dysertacji na pewno stała się odpowiedzią na pytania, które zadał sobie Doktorant przed przystąpieniem do badań naukowych. Przede wszystkim Autor stwierdził, że galaktooligosacharydy charakteryzując się wysokim potencjałem terapeutycznym, mogłyby być suplementowane jako uzupełnienie w terapii pacjentów cierpiących na zaburzenia lękowe, depresję czy zespół stresu pourazowego, ponadto zasadne mogłoby być ich stosowanie w kontekście działań profilaktycznych, zapobiegających rozwojowi zaburzeń związanych ze stresem, takich jak lęk i depresja.

W końcowej części dysertacji Doktorant formułuje trzy wnioski, które podsumowują uzyskane wyniki badań.

Z kolei w rozdziale Piśmiennictwo Autor cytuje 414 anglojęzycznych pozycji literatury. Cytowane są również publikacje z 2023 (38), a nawet 2024 roku (33), przedstawiają więc najnowszy i najbardziej aktualny stan wiedzy na zawarty w rozprawie doktorskiej temat. Cytowana literatura jest ściśle związana z tematem ocenianej pracy doktorskiej.

Na koniec tej części recenzji rozprawy doktorskiej mgr. Jana Rucińskiego zadam jeszcze jedno pytanie:

Jakie jest Pana stanowisko w temacie wykorzystania wyników badań prowadzonych na modelach zwierzęcych w terapii ludzi?

Podsumowanie i wniosek końcowy

Stwierdzam, że Pan mgr Jan Ruciński w całości zrealizował zadania badawcze. Zakres przeprowadzonych eksperymentów, wybór metod badawczych umożliwiły uzyskanie nowych i bardzo interesujących wyników. Podjęta tematyka jest bardzo aktualna, wiąże ze sobą zagadnienia z zakresu biologii i medycyny. Rozprawa doktorska powstała na podstawie bardzo dużego wkładu pracy w przeprowadzenie badań. Praca bardzo starannie napisana, doskonałym

językiem (co obecnie jest niestety coraz rzadsze). Doktorant ma umiejętność jasnego, syntetycznego, precyzyjnego, zrozumiałego dla czytelnika formułowania myśli, co wskazuje na jego dojrzałość naukową. Świadczy też o bardzo dobrym przygotowaniu Doktoranta do prowadzenia badań naukowych na wysokim poziomie. Ponadto, rozprawa wskazuje na duże oczytanie Doktoranta w temacie, umiejętność interpretacji skomplikowanych wyników i niewątpliwie wnosi nowe elementy do nauki. Jest znaczącym osiągnięciem Doktoranta.

W konkluzji, jednoznacznie twierdzę, że prowadzone badania stanowią rozwiązanie oryginalnego problemu naukowego założonego w celu badań, a przedłożona mi do oceny dysertacja pt. „Wpływ galaktooligosacharydów na behawior oraz wybrane obwodowe i ośrodkowe komponenty reakcji stresowej u szczurów w warunkach długotrwałej elektrycznej stymulacji jądra środkowego ciała migdałowatego" jest nowatorska, wartościowa i spełnia wszystkie wymogi określone w artykule 13 Ustawy z dnia 14 maca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. 2003, nr 65, poz. 595 z późn. zm.), w zw. z art. 179. Ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. 2018 poz.1669 z późn. zm.). W związku z powyższym przekładam Radzie Dyscypliny Nauki biologiczne Uniwersytetu Gdańskiego wniosek o przyjęcie rozprawy doktorskiej i dopuszczenie Pana mgr. Jana Rucińskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.