

Recenzent: Prof. dr hab. Jan Konopacki

Recenzja sporządzona dnia: 20. 08. 2024 r.

Recenzja

rozprawy doktorskiej pana mgr Jana Rucińskiego pt.:

„Wpływ galaktooligosacharydów na behavior 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 Uniwersytetu Gdańskiego

pod kierunkiem

dr hab. Jolanty Orzeł-Gryglewskiej, Profesor U.G.

1. Uwagi ogólne.

Mikrobiota jelitowa, składająca się nie tylko z różnych szczepów bakterii ale również wirusów i grzybów, jest niezwykle istotnym elementem naszego organizmu. Liczebność bakterii w gramie treści pochodzącej z jelita grubego wynosi około 10^{12} komórek. To powoduje, że stosunek komórek bakteryjnych do ludzkich w organizmie wynosi prawie 1:1. Co więcej, genom mikrobiomu jelitowego zawiera ponad 100x więcej genów niż genom ludzki. Z tego względu traktowanie jelita grubego i zamieszkującą je mikrobiotę jelitową jako nasz „drugi mózg” staje się w pełni zasadne i poparte wieloma obserwacjami naukowymi. Jak się okazuje, drobnoustroje zasiedlające jelito grube oraz produkowane przez nie neuroaktywne metabolity dzięki tzw. osi jelitowo-mózgowej mogą modulować funkcję układu immunologicznego, odpowiedź na stres oraz zachowanie.

Pytaniem zasadniczej wagi pozostaje zakres możliwego wpływu mikrobioty jelitowej na funkcjonowanie ośrodkowego układu nerwowego. Pytanie to jest o tyle istotne, że w ostatniej dekadzie pojawiły się wyniki prac badawczych, które jednoznacznie wskazują na udział wybranych gatunków i szczepów bakteryjnych pochodzących z jelit w kształtowaniu obrazu klinicznego chorób psychicznych. Zaburzenia lękowe, depresja czy zespół stresu pourazowego (PTSD) dotyka ok 40% ludzkiej populacji. Każda zatem rozprawa naukowa

adresująca problem interakcji jelito grube-ośrodkowy układ nerwowy powinna być z uwagą odnotowywana ze względu na wyjątkową rangę naukową i aplikacyjną.

2. Charakterystyka rozprawy

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska mgr Jana Rucińskiego adresuje wspomniany powyżej problem. Dobór modelu eksperymentalnego uważam za nadzwyczaj trafny bowiem jądro środkowe (CeA) ciała migdałowatego (Amg) z jednej strony włączone jest w ośrodkowy substrat neuronalny regulujący reakcje związane ze strachem i lękiem a z drugiej bierze udział w przetwarzaniu sygnałów pochodzących z mikrobioty jelitowej.

Recenzowana rozprawa doktorska ma klasyczny 4-rozd. układ. Opatrzona jest dodatkowo streszczeniami w j. polskim i angielskim, podsumowaniem wyników, wieloma tabelami i kolorowymi rycinami oraz spisem zastosowanych w pracy skrótów.

W ciekawie napisanym, bogato ilustrowanym i liczącym ponad 60 str. wstępie doktorant dokonuje charakterystyki ciała migdałowatego w kontekście odpowiedzi na stres. W kolejnym podrozdziale charakteryzuje rolę i funkcję osi mikrobiom-jelita-mózg w etiologii dysfunkcji psychicznych. Osobny podrozdział poświęcony jest roli galaktooligosacharydów (GOS) w terapii chorób psychicznych. Uważam, że po przeredagowaniu wstęp mógłby być opublikowany w naukowym czasopiśmie polskojęzycznym jako interesujący esej poświęcony interakcjom osi mikrobiom-jelita-mózg w powstawaniu dysfunkcji psychicznych, w tym zwłaszcza depresji czy zespołu stresu pourazowego. Wstęp kończy podrozdział uzasadniający główne założenia i cele rozprawy.

Postawione w pracy doktorskiej cele naukowe oceniam jako bardzo ambitne i wymagające trudnych i żmudnych badań. Co więcej, bez wątplenia mają one charakter nowatorski. Pierwszym celem przeprowadzonych doświadczeń było poszerzenie wiedzy na temat wpływu nadaktywności Amg wywołanej długotrwałą stymulacją elektryczną CeA na behawioralne, hematologiczne, immunologiczne i neurochemiczne komponenty odpowiedzi stresowej oraz jakościowy i ilościowy skład mikrobioty jelitowej u szczurów. Drugim celem przeprowadzonych badań była ocena potencjału terapeutycznego GOS w kontekście tłumienia zmian wywołanych długotrwałą stymulacją CeA a trzecim porównanie skuteczności suplementacji GOS z efektami wywołanymi terapią citalpromem (CIT), lekiem o działaniu przeciwlękowym i antydepresyjnym.

Na 20 str. autor szczegółowo opisuje zastosowane metody. Rozdział ten ma bardzo dobrą i klarowną konstrukcję. Na str. 69/70 mgr Jan Ruciński omawia sposób podawania GOS i CIT. Spożycie roztworów badanych substancji było codziennie monitorowane przez

ważenie poidel. Z przedstawionego opisu wnioskuję, że dawka obu związków była przybliżona chyba, że szacowano ją pośrednio jako procent ubytku roztworu o znanym stężeniu (?). Prosiłbym autora o komentarz w tej sprawie.

Muszę przyznać, że jestem pełen uznania dla doktoranta. Praca w zespole naukowym wykorzystującym liczne i bardzo trudne techniki laboratoryjne wymagała od mgr Jana Rucińskiego znakomitego teoretycznego przygotowania i opanowania dużej liczby metod laboratoryjnych w ograniczonym przecież czasie szkoły doktorskiej. W ramach niniejszej rozprawy zastosowano model elektrycznego drażnienia CeA. Natężenie prądu dobierano indywidualnie dla każdego zwierzęcia. Na str. 71 autor pisze, że (cyt.): *„pod koniec każdej sesji ustalano natężenie prądu, od którego zaczynało się stymulację CeA w kolejnym dniu, przy czym wartość tę stopniowo zwiększano z sesji na sesję”*. W tym miejscu prosiłbym doktoranta o odpowiedź na pytanie: czy zwiększanie natężenia prądu z sesji na sesję było podyktowane akomodacją tkanki mózgowej szczura do aplikowanego natężenia prądu czy innym czynnikiem?

Wyniki wielu eksperymentów i analiz zostały bardzo dokładnie przedstawione na 70 str. rozprawy. Rozdział ten jest ciekawie ilustrowany wieloma starannie opisanymi kolorowymi rycinami. Bardzo dobrym zabiegiem redakcyjnym autora było wprowadzenie osobnego podrozdziału pt.: Zestawienie głównych wyników uzyskanych w pracy. Ułatwia on czytelnikowi „ogarnięcie” wielu danych behawioralnych, wskaźników hematologicznych, wskaźników neurochemicznych, zmian w mikrobiocie jelitowej jak również wielu danych uzyskanych po suplementacji GOS oraz CIT.

Jak pokazały przeprowadzone badania, 14-dniowa elektryczna stymulacja CeA wywołała wzrost aktywności osi stresowej, prowadząc do wielu niekorzystnych zmian na poziomie behawioralnym, obwodowym i ośrodkowym a także zaburzenia ilościowe i jakościowe w mikrobiomie jelitowym u szczurów. W testach behawioralnych zwierząt wykazano wzrost aktywności motorycznej i wzorców zachowań lękowych. Obserwowano obniżenie prawie wszystkich podstawowych wskaźników morfotycznych krwi. Długotrwała stymulacja CeA przyczyniła się do nasilenia odpowiedzi stresowej: obserwowano obniżony poziom GABA, podwyższony poziom adrenaliny i noradrenaliny we wszystkich badanych strukturach mózgu oraz podwyższony poziom kortykosteronu w osoczu. Wykazano również zmiany stężenia cytokin, w tym obniżenie stężenia przeciwzapalnej IL-10, wzrost prozapalnego TNF-alfa.

Nadzwyczaj wartościowe, ciekawe i nowatorskie wyniki dotyczyły zmian w mikrobiocie jelitowej szczurów. Okazało się, że długotrwała stymulacja CeA spowodowała

istotne zmiany w liczebności wybranych gatunków bakterii w tym m.in. spadek liczebności gatunków pro-biotycznych. Co ciekawe, suplementacja GOS ogólnie odwróciła niekorzystne zmiany wywołane przez elektryczne drażnienie CeA. Obserwowano m.in. obniżenie aktywności motorycznej, zwiększenie wzorców zachowań pro-socjalnych oraz normalizację wskaźników hematologicznych. Podawanie GOS spowodowało szereg spektakularnych zmian: wzrost stężenia przeciwzapalnej IL-10 oraz obniżenie stężenia prozapalnego TNF-alfa. Przyjmowanie GOS spowodowało podwyższenie poziomu GABA oraz obniżenie poziomu adrenaliny i noradrenaliny we wszystkich badanych strukturach mózgu. Obniżeniu uległ również poziom kortykosteronu w osoczu. Istotne zmiany zaobserwowano w liczebności wybranych gatunków bakterii, w tym m.in. wzrost liczebności głównie gatunków pro-biotycznych. Suplementacja GOS okazała się bardziej skuteczna niż suplementacja CIT.

Dyskusja jest obszerna i wielowątkowa. Jednak znakomite jej zredagowanie pozwala czytelnikowi zrozumieć złożoność naukowych rozważań autora. Analiza uzyskanych wyników skłania doktoranta do sformułowania bardziej ogólnych refleksji, które zresztą w pełni podzielam. Otrzymane dane eksperymentalne wskazują na wysoki potencjał terapeutyczny GOS w ograniczeniu, lub nawet całkowitym zniesieniu, zmian wywołanych stymulacją elektryczną CeA. Wartość kliniczna tej obserwacji jest nie do przecenienia. GOS, jako prebiotyk, mógłby być wykorzystywany jako preparat wspomagający terapię pacjentów cierpiących na zaburzenia lekowe, depresję czy PTSD. Suplementacja GOS mogłaby być w przyszłości wykorzystana klinicznie w działaniach profilaktycznych, zapobiegających rozwojowi zaburzeń związanych z lękiem i stresem.

3. Podsumowanie

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska mgr Jana Rucińskiego wskazuje, że doktorant jest znakomicie przygotowany zarówno pod względem teoretycznym jak i praktycznym do samodzielnej pracy naukowej. Duża erudycja autora sprawiła, że bardzo obszerne, wielowątkowe i trudne badania zostały opisane w sposób klarowny merytorycznie i poprawnym językiem.

Recenzowana praca stanowi oryginalne rozwiązanie istotnego problemu naukowego. Jest starannie przemyślaną koncepcyjnie, bardzo dobrze wykonaną i opisaną rozprawą doktorską, co składa się na wartościową i dojrzałą pracę naukową. Autor wykazał się doskonałą znajomością literatury. Jednak cytowanie w pracy ponad 400 pozycji piśmiennictwa uważam za przesadę. Doktorant mógł jednak dokonać bardziej wnikliwej selekcji piśmiennictwa.

Uważam, że recenzowana rozprawa w pełni spełnia wymogi określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 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.). Na tej podstawie przedkładam Wysokiej Radzie Naukowej Dyscypliny Nauki biologiczne Uniwersytetu Gdańskiego wniosek o dopuszczenie mgr Jan Rucińskiego do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora.

Nie znalazłem w rozprawie informacji o publikacji przynajmniej części tak wartościowych wyników ani o ich prezentacji w postaci komunikatu konferencyjnego. Wielka szkoda. Pomimo nadzwyczaj szerokiego spektrum badanych i analizowanych zagadnień, nowatorstwa uzyskanych wyników i dużej wartości naukowej i aplikacyjnej rozprawy, brak jakiegokolwiek formy wcześniejszej prezentacji uzyskanych wyników nie upoważnia mnie do wystąpienia z wnioskiem o stosowne jej wyróżnienie.


Prof. dr hab. Jan Konopacki

