

RECENZJA

Rozprawy doktorskiej mgr inż. Justyny Kutorasińskiej p.t. „Wykorzystanie zaawansowanych metod spektroskopowych w badaniach nad patogenezą epilepsji na przykładzie modeli zwierzęcych”.

Przedstawiona do oceny rozprawa jest drugą wersją pracy, którą recenzowałam w 2016 r. i wnioskowałam o jej poprawienie. Wraz z rozprawą otrzymałam od Doktorantki adekwatne i wyczerpujące odpowiedzi na uwagi krytyczne do pierwszej wersji rozprawy. Niniejsza recenzja opierać się będzie wyłącznie na tekście poprawionym, bez odwołań do poprzedniej wersji pracy. Będę natomiast posiłkować się fragmentami mojej poprzedniej recenzji we fragmentach, w których moja ocena się nie zmieniła. Fragmenty skopiowane z poprzedniej recenzji zaznaczone będą kursywą.

Padaczka jest jedną z najczęstszych chorób mózgu. Szacuje się, że na padaczkę cierpi około 1% populacji, czyli około 400 tys. osób w Polsce. U ponad 60% pacjentów cierpiących na padaczkę przyczyna rozwoju tej choroby jest nieznaną. W niektórych przypadkach udaje się ustalić, co spowodowało rozwój padaczki. Na przykład częstą przyczyną padaczki jest uszkodzenie mózgu spowodowane np. przez guzy mózgu, uraz mózgu, choroby neurodegeneracyjne, udar lub infekcje mózgu. Uszkodzenie mózgu zapoczątkowuje szereg patologicznych zmian w strukturze i funkcjonowaniu mózgu, które w efekcie prowadzą do zwiększenia pobudliwości mózgu i pojawienia się drgawek. Najczęściej po uszkodzeniu mózgu następuje okres wolny od drgawek a do zachorowania na padaczkę dochodzi wiele miesięcy lub nawet lat po zdarzeniu. Okres między zdarzeniem, które wywołało uszkodzenie mózgu a pojawieniem się pierwszych drgawek, czyli diagnozą padaczki, nazywamy epileptogenezą. Ten długi okres rozwoju choroby mógłby stanowić wygodne okienko czasowe do interwencji farmakologicznej, której celem miałyby być zahamowanie rozwoju choroby. Jednak jak dotąd skuteczne strategie, które zapobiegałyby rozwojowi padaczki po urazie mózgu nie istnieją. Nie ma też metod umożliwiających stwierdzenie, którzy pacjenci z grupy podwyższonego ryzyka zachorują na padaczkę w przyszłości.

Choć opisano liczne zjawiska i procesy zachodzące w mózgu po urazie, nie jest jasne, które z nich są przyczyną rozwoju choroby. Właśnie z braku pełnego zrozumienia zjawisk indukowanych przez uraz zapoczątkowujący proces rozwoju padaczki wynika brak sukcesów w projektowaniu terapii przeciwepileptogenicznych. Dlatego też opisywanie zmian wywołanych w tkance przez bodźce epileptogenne może doprowadzić do lepszego zrozumienia epileptogenezy, co może przynieść nowe strategie jej zapobiegania. Podjęcie przez mgr. Justynę Kutorasińską badań mających na celu analizę zmian w akumulacji i strukturze wybranych związków w modelach zwierzęcych padaczki było zatem zasadne.

Omówienie wyników. W części doświadczalnej rozprawy opisane są wyniki dwóch doświadczeń. W pierwszym doświadczeniu Doktorantka scharakteryzowała inkluzje pojawiające się w hipokampie szczura w wyniku stanu padaczkowego wywołanego podaniem pilokarpiny. Tkanka pobrana została w dwóch punktach czasowych: 6 i 72 godziny po podaniu konwulsanta. Doktorantka dowiodła, że liczba inkluzji zwiększa się w niektórych obszarach hipokampa po 6 godzinach, i w większym stopniu po 72 godzinach po podaniu pilokarpiny. Ponadto Doktorantka scharakteryzowała skład inkluzji, pokazując, że zawierają one kreatynę oraz stwierdziła, że ich liczba skorelowana jest z czasem trwania drgawek. W drugim doświadczeniu badany był skład biochemiczny w prawidłowym hipokampie oraz w hipokampie zwierząt poddanych procedurze rozniecania. Wyniki analizy wskazują, że w wyniku rozniecania dochodzi do zmian w strukturze drugorzędowej białek, zmian strukturalnych tłuszczów i zmian we wzajemnym stosunku różnych grup związków. Ponadto Doktorantka wykryła liczne korelacje między badanymi parametrami biochemicznymi i cechami drgawek rozniecanych. Inkluzje pojawiające

się w hipokampie w wyniku rozniecania, w przeciwieństwie do tych wykrytych po drgawkach wywołanych pilokarpiną, zawierały cholesterol, a nie kreatynę. Przedstawione w rozprawie wyniki zostały już opublikowane w renomowanych czasopismach o zasięgu międzynarodowym, specjalizujących się w chemii i technikach chemii analitycznej. Wyniki zostały więc już poddane ocenie niezależnych recenzentów. Również w mojej opinii nie budzą wątpliwości.

Ocena formalnej strony pracy. Licząca 111 stron praca ma nietypowy układ. Pracę rozpoczyna Indeks Skrótów, po którym następują streszczenia w języku polskim i angielskim.

Tradycyjny Wstęp zastępują dwa rozdziały: 1. Wprowadzenie do Epilepsji i 2. Wprowadzenie Teoretyczne do Spektroskopii Oscylacyjnej. Rozdział 1. stanowi syntetyczne omówienie definicji i podstawowych zagadnień dotyczących padaczki i epileptogenezy, anatomii hipokampa i stosowanych w pracy modeli zwierzęcych, które w sposób wystarczający wprowadza do tematyki podjętej w części doświadczalnej. Uchylam się tutaj od komentowania treści rozdziału 2. i wszelkich zagadnień dotyczących teoretycznych podstaw spektroskopii z powodu braku kompetencji w tej dziedzinie.

W rozdziale 3. Motywacja i Cel Pracy Doktorantka w obszerny sposób uzasadnia, dlaczego podjęta badania przedstawione w rozprawie. Prawidłowo formułuje cel pracy i cele szczegółowe.

Metody wykorzystane w pracy omówione zostały w trzech rozdziałach: 4. Materiał Badawczy, 5. Aparatury i Warunki Pomiarowe oraz 6. Przygotowanie Danych do Analizy. Opis metod jest wystarczająco szczegółowy. Brakuje mi jedynie informacji, w jakim czasie po ostatniej stymulacji rozniecania uśmiercano zwierzęta.

Opis wyników pracy podzielony został na dwa rozdziały. Pierwszy z nich opisuje cykl doświadczeń mających na celu scharakteryzowanie inkluzji w hipokampie po stanie padaczkowym wywołanym podaniem pilokarpiny (Rozdział 7). Drugi omawia wyniki badań zmian biochemicznych i inkluzji w hipokampie modelu rozniecania (Rozdział 8). Wyniki opisane są w sposób klarowny i łatwy do śledzenia przez czytelnika.

Sześciostronicowy rozdział 9. Dyskusja Wyników omawia różne aspekty uzyskanych wyników na tle literatury przedmiotu, w tym potencjalne znaczenie inkluzji oraz możliwe mechanizmy ich powstawania. Dyskusja jest wyczerpująca i bardzo interesująca. Dowodzi dużej erudycji Autorki i znajomości literatury. Doktorantka nie podjęła się w Dyskusji syntezy danych z dwóch użytych przez nią modeli zwierzęcych, a w szczególności różnic w składzie inkluzji zależnych od modelu badawczego. Mogłoby to doprowadzić do ciekawych wniosków.

W rozdziale 9. Wnioski przedstawiono podsumowanie wyników oraz omawia zalety wykorzystanych technik spektroskopowych w badaniach przedklinicznych.

Rozprawę zamykają Aneks (zawierający szczegółowe dane analiz statystycznych) oraz licząca 195 pozycji literatury i 8 stron internetowych Bibliografia.

Moje ogólne wrażenie z czytania pracy jest bardzo dobre. Praca jest starannie sformatowana, zawiera estetyczne ryciny, napisana jest ładnym językiem. Autorka ustrzegła się literówek (zauważyłam tylko 2) i znaczących błędów językowych. Teks pisany jest w sposób logiczny i klarowny.

Wyjaśnienia wymagają jedynie następujące kwestie:

- na stronie 15 Autorka stwierdza, że „w mózgach szczurów poddanych wielokrotnej stymulacji występuje .. ubytek interneuronów we wnętrzu zakrętu zębatego”. Powołuje się przy tym na pracę Brandt et al. 2004. Należy zaznaczyć, że Brandt et al. zaobserwowali spadek gęstości neuronów we

wnęce hipokampa, ale nie neurodegenerację. Wynik tłumaczy zwiększeniem objętości hipokampa. Dodatkowo w pracy tej nie badano specyficznie interneuronów;

- str. 16 – co Autorka rozumie przez „liczbę reakcji glikolitycznych”?

- opis morfologii CA1 i CA2 na stronie 16 może być mylący. Na skrawkach hipokampa to CA2 wydaje się być tą szerszą warstwą;

- na str. 80 Autorka powołuje się na pracę Kim et al. 2010. Należy jednak pamiętać, że „faza chroniczna” wg Kim et al. Dotyczy punktu czasowego 4 tygodnie po SE, nie jest więc tożsama z fazą chroniczną badaną w niniejszej rozprawie;

- co należy rozumieć przez stwierdzenie, że „cholesterol jest głównym budulcem struktur mózgowych”? (str. 84), oraz

- „cholesterol jest wyższy w neuronach”? (str. 84).

Podsumowanie: Z przyjemnością stwierdzam, że poprawiona wersja rozprawy spełnia moje oczekiwania dotyczące prac tego typu. Autorka opisała i zinterpretowała wyniki swoich doświadczeń w dojrzały sposób. Udowodniła swoją dojrzałość jako badacz, erudycję i znajomość przedmiotu badań. Rozprawa spełnia wymagania stawiane w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 z późn. zm.). W związku z tym wnioskuję o dopuszczenie mgr inż. Justyny Kutorasińskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Katarzyna Łukasiuk

dr hab. Katarzyna Łukasiuk, prof. n.

Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN

ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa

e-mail: k.lukasiuk@nencki.gov.pl, tel: (22) 5892 434