

Warszawa, 11 lipca 2023 r.

Prof. dr hab. Alina Gajewska

Zakład Fizjologii Zwierząt

Instytut Fizjologii i Żywienia Zwierząt im Jana Kielanowskiego PAN

Jabłonna k Warszawy

Recenzja rozprawy doktorskiej Pana mgr Pawła Napory zatytułowanej „**Kompensacja komunikacji nerwowo-odpornościowej po zahamowaniu aktywności cyklooksygenaz**”, wykonanej pod kierunkiem promotora Pana dr hab. Marka Wieczorka w Katedrze Neurobiologii Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego w ramach Stacjonarnych Studiów Doktoranckich Mikrobiologii, Biotechnologii i Biologii Eksperymentalnej.

I. Ocena formalna rozprawy

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska składa się z (i) trzech prac (dwóch publikacji i jednego manuskryptu złożonego do druku), w których Pan mgr Paweł Napora jest pierwszym autorem (ii) oraz powstałego na podstawie wyników własnych badań opracowania w języku polskim, przedstawionego w formie typowej dla tekstu naukowego, zawierającego: wprowadzenie, przyjętą hipotezę i cele badawcze, opis zastosowanego schematu eksperymentalnego wraz z charakterystyką użytego materiału i wykorzystanych metod analitycznych, opis uzyskanych wyników z ich omówieniem, wnioski wypływające z badań, bibliografię oraz streszczenia w języku polskim i angielskim.

Pracami wchodzącymi w skład rozprawy są:

1. Praca przeglądowa w języku polskim w czasopiśmie recenzowanym:

Napora P., Kobrzycka A., Wieczorek M. Prostaglandyna E2 jako cząsteczka komunikacji pomiędzy układem nerwowym i odpornościowym. Kosmos 2020;69(2):287-300. Liczba punktów MEiN: 20.

2. Praca oryginalna: **Napora P.**, Kobrzycka A., Pierzchała – Kozić K., Wieczorek M. Effect of selective cyclooxygenase inhibitors on animal behaviour and monoaminergic systems of the rat brain. Behavioural Brain Research 2023;438:114143. IF=3.352. Liczba punktów MEiN: 100.

3. Praca oryginalna w formie manuskryptu przesłanego do redakcji czasopisma Behavioural Brain Research: **Napora P.**, Kobrzycka A., Pierzchała – Kozić K., Wieczorek M. “Effect of selective cyclooxygenase inhibitors on amino acid neurotransmitters of the rat brain”.

Do obu publikacji oraz manuskryptu zostały dołączone pisemne oświadczenia wszystkich współautorów, w których szczegółowo określili oni zakres swego indywidualnego wkładu w wykonanie badań i przygotowanie tekstów publikacji. Treść oświadczeń jednoznacznie wskazuje na wiodący udział mgr Pawła Napory we wszystkich etapach powstawania prac włączonych do rozprawy.

W pracy 1 (*Kosmos*, 2020) udział Doktoranta w przygotowaniu publikacji wynosił 80% i polegał na napisaniu manuskryptu na podstawie przeglądu i doboru piśmiennictwa oraz edytorskim opracowaniu finalnej wersji tekstu.

W pracy 2 (*Behavioural Brain Research*, 2023) merytoryczny udział Doktoranta w powstanie publikacji wynosił 70% i obejmował: oznaczenie zawartości monoamin w wyizolowanych strukturach mózgu wykonane metodą chromatografii wysokociśnieniowej oraz interpretację otrzymanych wyników, analizę danych uzyskanych w testach behawioralnych, analizę danych biochemicznych dotyczących stężenia związków prozapalnych w osoczu, analizę statystyczną pozyskanych danych eksperymentalnych oraz napisanie manuskryptu i pracę nad edytorskim przygotowaniem go do publikacji.

W pracy 3 (*Effect of selective cyclooxygenase inhibitors on amino acid neurotransmitters of the rat brain*) indywidualny wkład Doktoranta w przygotowanie manuskryptu był równy 70% i polegał na wykonaniu chromatograficznego oznaczenia stężeń aminokwasów zawartych w strukturach mózgowia szczurów, wraz z interpretacją otrzymanych wyników, analizie danych biochemicznych dotyczących stężenia związków prozapalnych w osoczu, analizie statystycznej pozyskanych danych eksperymentalnych oraz napisaniu manuskryptu i pracy nad przygotowaniem go do publikacji.

Układ ocenianej rozprawy spełnia wymogi formalne stawiane rozprawom doktorskim powstałym na podstawie własnych badań eksperymentalnych. Wiodące, potwierdzone oświadczeniami współautorów, zaangażowanie Pana mgr Pawła Napory w wykonanie pracy eksperymentalnej, opracowanie statystyczne otrzymanych wyników, jak też w przygotowanie każdej z powyższych publikacji i manuskryptu w mojej ocenie w pełni uzasadnia ich łączne przedstawienie jako części Jego rozprawy doktorskiej.

II. Ocena merytoryczna rozprawy

Podstawą eksperymentalną ocenianej rozprawy są dwa, przeprowadzone według identycznego schematu, doświadczenia *in vivo* wykonane na modelu trzymiesięcznych samców szczura Wistar pozyskanych z hodowli outbredowej prowadzonej na Uniwersytecie Medycznym w Białymstoku. Doktorant uzyskał zgodę Lokalnej Komisji Etycznej w Łodzi na wykorzystanie zwierząt w zakresie zaplanowanych procedur badawczych.

Jednym z kluczowych warunków homeostazy jest funkcjonowanie złożonych mechanizmów regulacyjnych, które zapewniają równowagę między procesami aktywującymi a procesami przeciwdziałającymi stanom zapalnym w organizmie. Rozwój takiego stanu może nastąpić w wyniku interakcji komórek odpornościowych z czynnikami prozapalnymi, czego konsekwencją jest synteza i uwolnienie specyficznych cząsteczek sygnałowych o szerokim spektrum działania i obejmującym przekazanie informacji o zapaleniu do ośrodkowego układu nerwowego. Odbiór sygnału uruchamia wówczas zwrotne, centralnie regulowane procesy przeciwzapalne, których skutkiem jest zapobieżenie nadmiernemu pobudzeniu układu immunologicznego. Warunkiem fizjologicznej efektywności tego precyzyjnego mechanizmu regulatorowego jest stała komunikacja między układem odpornościowym a nerwowym, którą zapewniają dwie odmienne drogi: nerwowa operująca za pośrednictwem nerwów obwodowych i humoralna wykorzystująca mediatory syntetyzowane i uwalniane przez liczne wyspecjalizowane typy komórek uczestniczących w regulacji procesów odpornościowych. Jednymi z najważniejszych cząsteczek wykorzystywanych w komunikacji odpornościowo-nerwowej są, należące do mediatorów lipidowych prostaglandyny, których synteza zależy od aktywności enzymu cyklooksygenazy występującemu w komórce w postaci dwóch lizoforn: cyklooksygenazy-1 (COX-1) i cyklooksygenazy-2 (COX-2). Ze względu na znaczenie prostaglandyny E2 w przekazywaniu do ośrodkowego układu nerwowego sygnału o wzbudzeniu układu odpornościowego stała się ona obiektem zainteresowań badawczych Doktoranta.

Aby zweryfikować przyjętą hipotezę badawczą zakładającą, że w centralnym układzie nerwowym (CUN) może dojść do indukcji wewnątrzkomórkowych mechanizmów kompensujących długotrwałe obwodowe zahamowanie syntezy prostaglandyn i w konsekwencji aktywności ścieżki komunikacji odpornościowo-nerwowej, Doktorant zaproponował dobrze przemyślany i klarowny schemat badań, zgodnie z którym zwierzętom przez 10 dni podawano podskórnie selektywny inhibitor cyklooksygenazy COX-1 (SC560) lub selektywny inhibitor cyklooksygenazy COX-2 (celekoksyb). Po tym czasie zwierzęta otrzymywały jednorazową dootrzewnową dawkę lipopolisacharydu (LPS) lub 0.9% chlorku sodu (NaCl). Po upływie 120 minut, od połowy zwierząt z każdej grupy eksperymentalnej pobierano pień mózgu, podwzgórze, ciało migdałowate, hipokamp, przyśrodkową korę przedczołową, istotę szarą wodociągową oraz krew, natomiast drugą połowę zwierząt poddawano pięciominutowemu testowi uniesionego labiryntu krzyżowego (*ang. elevated plus maze EPM*), po którym pozyskiwano od nich takie same struktury do zaplanowanych analiz. Część analityczna pracy została wykonana z wykorzystaniem prawidłowo dobranych technik badawczych. Do oznaczenia stężenia monoamin (noradrenaliny, dopaminy, serotoniny) i ich metabolitów, oraz stężenia asparaginianu, glutaminianu, glicyny, kwasu gama masłowego (GABA), tyrozyny

i tryptofanu w wyizolowanych strukturach mózgu zastosowano chromatografię wysokociśnieniową (HPLC). Stężenie cytokin prozapalnych (IL-1 β , IL-6 oraz TNF α) w osoczu oznaczono metodą ELISA, natomiast stężenie kortykosteronu metodą RIA. Do analizy danych z przeprowadzonych testów behawioralnych wykorzystano specjalistyczne oprogramowanie.

II.1. Część publikacyjna rozprawy

Praca 1. Publikacja jest poświęcona prostaglandynie E2 (PGE2), jednej z kluczowych cząsteczek sygnałowych uczestniczących w procesie komunikacji między układem odpornościowym a nerwowym i tym samym regulujących stan homeostazy organizmu. Jej treść odzwierciedla zainteresowania badawcze Doktoranta zarysowując naukowe tło, z którego wynika waga badań dotyczących neuroimmunomodulacyjnej aktywności PGE2. W tym kontekście włączenie tej publikacji do rozprawy doktorskiej jest w pełni uzasadnione. Artykuł rozpoczyna się zwięzłą charakterystyką humoralnej drogi wymiany informacji między oboma wspomnianymi układami. Następnie tekst skupia się na prostaglandynach jako najważniejszej klasie mediatorów lipidowych. Prezentuje obie izoformy cyklooksygenaz, z uwzględnieniem ich specyfiki funkcjonalnej, informuje o lokalizacji i aktywności tych enzymów w centralnym układzie nerwowym, opisuje ścieżki syntezy prostaglandyny E2 oraz wskazuje drogi, przez które hormon, pełniąc rolę mediatora pierwszo i drugorzędowego, przekazuje do mózgu sygnał o wzbudzeniu układu immunologicznego. Dalszy fragment odnosi się do aktywności specyficznych dla prostaglandyn receptorów EP1 EP2, EP3 i EP4. Po ich scharakteryzowaniu, Autorzy przechodzą do opisu wielokierunkowej reakcji ośrodkowego układu nerwowego na obwodowy stan zapalny, do omówienia regulacji aktywności enzymatycznej cyklooksygenaz z uwzględnieniem roli niesterydowych leków przeciwzapalnych, a następnie do zarysowania roli cyklooksygenazy-2 w patogenezie chorób neurodegeneracyjnych.

Praca 2. Publikacja prezentuje wyniki endogennej i behawioralnej odpowiedzi zwierząt eksperymentalnych w postaci zmian (i) aktywności każdego z trzech układów transmisji monoaminergicznej w wybranych strukturach mózgu, (ii) stężenia cytokin prozapalnych i kortykosteronu w osoczu, (iii) charakterystyki zachowań w stanie zapalnym.

(i) *Aktywność układu noradrenergicznego.* Stężenie noradrenaliny w pniu mózgu i przyśrodkowej korze przedczołowej wzrosło w warunkach zahamowanej aktywności COX-2, jednak w obu strukturach zmiany te nie zależały od indukcji stanu zapalnego. Reakcja układu noradrenergicznego po inhibicji aktywności COX-1 pojawiła się jedynie w pniu mózgu, w którym zwiększone stężenie NA odnotowano tylko u zwierząt w stanie aseptycznym. Porównanie dynamiki zmian wartości indeksu MHPG/NA w pniu mózgu i przyśrodkowej korze przedczołowej wskazuje, że w obu tych strukturach przekazywanie informacji o obwodowym

stanie zapalnym do układu noradrenergicznego odbywa się przede wszystkim za pomocą szlaku COX-2-PGE2. Świadczy o tym obniżenie aktywności układu noradrenergicznego obserwowane w obecności inhibitora cyklooksygenazy-2 tylko u zwierząt w stanie zapalnym. Inhibicja cyklooksygenazy-1 nie wywołała takiego efektu.

Aktywność układu dopaminergicznego. Konsekwencją zahamowania aktywności COX-1 i COX-2 w warunkach aseptycznych i septycznych były znaczące zmiany w układzie dopaminergicznym. W stanie zapalnym u zwierząt bez zahamowanej aktywności cyklooksygenaz obniżenie wewnątrzkomórkowego stężenia dopaminy pojawiło się w hipokampie. Strukturą najbardziej wrażliwą było podwzgórze, w którym, w warunkach inhibicji COX-1 i COX-2, spadek ten pojawił się zarówno w stanie aseptycznym jak i septycznym. W przyśrodkowej korze przedczołowej obniżony poziom DA stwierdzono tylko u zwierząt bez stanu zapalnego i po inhibicji COX-2. W każdej z badanych struktur nastąpiły specyficzne dla nich wewnątrzkomórkowe zmiany dynamiki metabolizmu dopaminy, mierzone stosunkiem DOPAC/DA. W pniu mózgu nasilenie metabolizmu wystąpiło jedynie w warunkach aseptycznych po zahamowaniu aktywności COX-1 i COX-2. W podwzgórzu wzrost ten dotyczył zwierząt z zahamowaną aktywnością COX-2 i bez stanu zapalnego, jak też zwierząt z zahamowaną aktywnością COX-1 w warunkach niezapalnych oraz zapalnych. W hipokampie zwiększony metabolizm DA odnotowano tylko w warunkach niezapalnych u zwierząt z zahamowaną aktywnością COX-1 i COX-2. Najbardziej wszechstronna reakcja na zahamowanie aktywności każdej z cyklooksygenaz wystąpiła w przyśrodkowej korze przedczołowej, w której podwyższony obrót dopaminy pojawił się zarówno u zwierząt bez stanu zapalnego, jak i u zwierząt z wywołanym stanem zapalnym.

Także zewnątrzkomórkowa aktywność układu dopaminergicznego była zróżnicowana. W podwzgórzu spadek stężenia DA po podaniu inhibitorów COX-1 i COX-2 nastąpił w warunkach aseptycznych jak i septycznych. W hipokampie obniżenie stężenia pojawiło się w stanie zapalnym, któremu nie towarzyszyła inhibicja aktywności żadnej z cyklooksygenaz, natomiast w korze przedczołowej spadek dotyczył zwierząt bez stanu zapalnego, lecz z zahamowaną aktywnością COX-2. W pniu mózgu zewnątrzkomórkowy metabolizm dopaminy (określany na podstawie wartości stosunku HVA/DA) obniżył się w stanie aseptycznym po inhibicji COX-1 i COX-2. W podwzgórzu wzrost wartości indeksu HVA/DA towarzyszył inhibicji COX-1 w warunkach niezapalnych i zapalnych. Inhibicja COX-2 również spowodowała zwiększoną wartość indeksu w tej strukturze, jednak efekt taki wystąpił tylko u zwierząt bez stanu zapalnego. Ponadto, w stanie zapalnym aktywność metaboliczna DA w podwzgórzu była wyższa w obecności inhibitora COX-1 niż w obecności inhibitora COX-2.

W hipokampie podwyższony metabolizm dopaminy obserwowano u zwierząt bez stanu zapalnego i z zahamowaną aktywnością COX-1

Aktywność układu serotonergicznego. Zwiększenie stężenia serotoniny w pniu mózgu wystąpiło tylko w warunkach aseptycznych i w obecności inhibitora COX-2. W hipokampie obniżenie stężenia serotoniny po zahamowaniu aktywności obu cyklooksyzgenaz dotyczyło zwierząt w stanie aseptycznym. W stanie zapalnym, najniższe stężenie serotoniny w tej strukturze odnotowano u zwierząt z zahamowaną aktywnością COX-1. W przyśrodkowej korze przedczołowej zmniejszenie stężenia serotoniny po zahamowaniu aktywności COX-2 pojawiło się zarówno w warunkach aseptycznych jak i septycznych. Charakterystykę aktywności układu serotonergicznego w badanych strukturach umożliwiło wyznaczenie stosunku 5-HIAA/5-HT. W pniu mózgu aktywność ta wzrosła po indukcji stanu zapalnego u zwierząt z aktywnymi cyklooksyzgenazami, jak i w warunkach aseptycznych, ale po zahamowaniu aktywności COX-1 i COX-2. W podwzgórzu zwierząt w stanie niezapalnym nasilenie metabolizmu serotoniny wystąpiło po inhibicji każdej z cyklooksyzgenaz, natomiast w ich hipokampie taki efekt pojawił się tylko po zablokowaniu aktywności COX-1. Największe zmiany aktywności układu serotonergicznego dotyczyły przyśrodkowej kory przedczołowej. Konsekwencją hamowania aktywności COX-1 i COX-2 warunkach aseptycznych jak i septycznych była zwiększona wartość indeksu 5-HIAA/5-HT w tej strukturze.

(ii) *Stężenie cytokin prozapalnych i kortykosteronu.* Po indukcji stanu zapalnego wzrost stężenia interleukiny-6 nastąpił zarówno w osoczu zwierząt kontrolnych jak i zwierząt otrzymujących specyficzne inhibitory cyklooksyzgenaz. Istotny wzrost stężenia kortykosteronu w osoczu pojawił się u zwierząt z zahamowaną aktywnością COX-2 i wywołanym stanem zapalnym.

(iii) *Zachowanie zwierząt.* W teście behawioralnym obniżoną aktywność lokomotoryczną wykazywały zwierzęta z wywołanym stanem zapalnym, a jej nasilenie obserwowano jedynie w warunkach inhibicji COX-2 u zwierząt bez stanu zapalnego. Długotrwałe oddziaływanie inhibitora COX-2 nie wpływało jednak na zależne od zapalenia zmiany aktywności lokomotorycznej. Analiza graficznej mapy lokalizacji zwierząt na arenie testu (ang. heat map) wskazała, że zwierzęta w stanie zapalnym z zahamowaną aktywnością COX-1 częściej wybierały i dłużej pozostawały w zamkniętym ramieniu labiryntu.

Praca 3. W żadnej z badanych struktur (ciało migdałowe, podwzgórze, pień mózgu, istota szara okołowodociągowa, hipokamp) stan zapalny wywołany przy zachowanej aktywności obu cyklooksyzgenaz nie spowodował zmian w stężeniu kwasu asparaginowego, glicyny, tyrozyny, GABA i tryptofanu. Jediną konsekwencją zapalenia u takich zwierząt był spadek stężenia glutaminianu zaobserwowany tylko w podwzgórzu. Zmiany stężenia specyficzne dla każdej

struktury i każdego z badanych aminokwasów pojawiały się natomiast przy zahamowanej aktywności cyklooksygenaz w warunkach aseptycznych i zapalnych.

Ciało migdałowe. W stanie aseptycznym zahamowanie aktywności każdej z cyklooksygenaz spowodowało wzrost stężenia asparaginanu z silniejszym efektem po aplikacji inhibitora COX-2. Stymulujący wpływ inhibitorów utrzymywał się w stanie zapalnym, jednak dalszy wzrost stężenia asparaginanu pojawił się tylko w obecności inhibitora COX-1. Ponadto, skutkiem zahamowanej aktywności cyklooksygenazy-1 był niezależny od stanu zapalnego spadek stężenia tyrozyny oraz wzrost stężenia glicyny w tej strukturze.

Pień mózgu. Wynikiem zahamowania aktywności COX-1 i COX-2 był wzrost stężenia glicyny u zwierząt zarówno w stanie aseptycznym jak i septycznym. Natomiast zwiększony poziom GABA w obu tych stanach fizjologicznych był efektem inhibicji COX-2. Stymulujący wpływ inhibitora COX-1 na stężenie GABA w pniu mózgu ujawnił się tylko u zwierząt bez stanu zapalnego.

Hipokamp. W obecności inhibitora COX-2, stężenie asparaginanu zmalało zarówno u zwierząt w stanie aseptycznym jak i septycznym. Natomiast obniżający wpływ inhibitora COX-1 ujawnił się jedynie u zwierząt z wywołanym stanem zapalnym. Blokada aktywności cyklooksygenazy-2 w stopniu większym niż blokada aktywności cyklooksygenazy-1 zredukowała stężenie tego aminokwasu w hipokampie. W warunkach septycznych podanie każdego z inhibitorów powodowało spadek poziomu glutaminianu, choć silniejszy efekt obniżający wystąpił w obecności inhibitora COX-2. Wzrost stężenia glicyny obserwowano w obecności inhibitora COX-1 działającego u zwierząt w stanie aseptycznym. Jednak po wywołaniu stanu zapalnego u zwierząt z zahamowaną aktywnością COX-1, stężenie glicyny w hipokampie zmalało. Także poziom tyrozyny hipokampie zależał od aktywności cyklooksygenazy-1, gdyż jej inhibicja w warunkach zapalnych doprowadziła do spadku zawartości tego aminokwasu w hipokampie. Największe stężenie GABA obserwowano po inhibicji COX-1 u zwierząt bez stanu zapalnego, natomiast przy zahamowanej aktywności COX-2 oraz w warunkach septycznych stężenie to zmalało. Od aktywności cyklooksygenazy-1 w stanie zapalnym zależało też stężenie tryptofanu hipokampie, gdyż inhibicja COX-1 u takich zwierząt spowodowała spadek poziomu tego aminokwasu.

Podwzgórze. U zwierząt w stanie aseptycznym ujawniła się bezpośrednia zależność między aktywnością badanych cyklooksygenaz a stężeniem glutaminianu w podwzgórze. Skutkiem inhibicji COX-1 lub inhibicji COX-2 było bowiem znaczne obniżenie stężenia tego aminokwasu w tej strukturze. Natomiast w warunkach septycznych spadek poziomu glutaminianu obserwowano jedynie w obecności inhibitora COX-1. Pochodną aktywności cyklooksygenazy-1

w podwzgórzu był także poziom glicyny, gdyż w obu stanach fizjologicznych inhibicja tego enzymu prowadziła do obniżenia jej stężenia. Odwrotną zależność od aktywności COX-1 obserwowano w odniesieniu do poziomu tyrozyny, której stężenie w podwzgórzu zwierząt w stanie aseptycznym wzrosło po zahamowaniu aktywności tego enzymu. W warunkach niezapalnych odnotowano spadek stężenia GABA w podwzgórzu i był on konsekwencją zarówno inhibicji cyklooksygenazy-1 jak i inhibicji cyklooksygenazy-2. W stanie zapalnym obniżone stężenie GABA pojawiło się jedynie w warunkach zahamowanej aktywności COX-1. Każda specyficzna inhibicja aktywności cyklooksygenazy efektywnie wpłynęła na zmniejszenie stężenia tryptofanu w warunkach aseptycznych. W stanie zapalnym spadek stężenia tryptofanu obserwowano jedynie w obecności inhibitora COX-1.

Istota szara okołowodociągowa. Zmiany w poziomie asparaginy wystąpiły jedynie w warunkach stanu zapalnego wywołanego w obecności inhibitora COX-1. U takich zwierząt stężenie asparaginy w tej strukturze znacząco wzrosło. W stanie aseptycznym skutkiem zahamowania aktywności cyklooksygenazy-1 było obniżenie stężenia glutaminianu. Natomiast wzrost poziomu tego aminokwasu pojawił się w obecności inhibitora COX-2 w warunkach niezapalnych. Wzrost stężenia tyrozyny nastąpił w stanie zapalnym przy zahamowanej aktywności cyklooksygenazy-1 oraz w warunkach aseptycznych jak i septycznych przy zahamowanej aktywności cyklooksygenazy-2. Stężenie GABA w warunkach niezapalnych zależało od aktywności COX-2, bowiem w obecności jej inhibitora poziom tego aminokwasu wzrósł. W stanie zapalnym inhibicja COX-1 doprowadziła do obniżenia stężenia tryptofanu w istocie szarej okołowodociągowej. Ponadto, relatywnie wyższe, niż w warunkach inhibicji COX-2, stężenie tryptofanu odnotowano u zwierząt z zahamowaną aktywnością COX-1. W osoczu stężenie interleukiny 1 β wzrosło jedynie po inhibicji aktywności COX-1 w stanie septycznym. Po indukcji stanu zapalnego wzrost stężenia TNF α wystąpił zarówno u zwierząt kontrolnych jak i u zwierząt z zahamowaną aktywnością COX-1 i COX-2.

Lektura prac nasunęła mi następujące pytania:

1. Wyniki badań ujawniły, że zakres i profil zmian analizowanych parametrów w badanych strukturach mózgu był odmienny dla każdego specyficznego inhibitora COX. Jakiego wpływu na aktywność analizowanych struktur mózgu można byłoby oczekiwać w wyniku jednoczesnej inhibicji obu cyklooksygenaz?
2. W badanych strukturach mózgu specyficzne reakcje aminokwasowych układów neurotransmisyjnych na egzogeny sygnał zapalny ujawniły się tylko w warunkach zahamowanej aktywności COX-1 lub COX-2. Czym można tłumaczyć generalny brak reakcji układów aminokwasowych w tych strukturach, z wyjątkiem obniżenia stężenia glutaminianu

w podwzgórzu, na wzbudzone zapalenie przy zachowanej aktywności obu cyklooksygenaz a więc przy niezakłóconej funkcji mediatorowej prostaglandyny E2?

3. Jakie mogą być przyczyny znacznie liczniejszych reakcji aminokwasowych układów transmisyjnych obserwowanych po zahamowaniu aktywności COX-1 niż tych po inhibicji COX-2, co jest widoczne zwłaszcza w hipokampie, ciele migdałowatym i podwzgórzu?

4. Jak można skomentować ogólną redukcję aktywności układów aminokwasowych w podwzgórzu jaka zaszła w obecności inhibitorów cyklooksygenaz?

5. W badaniach Doktoranta krótkotrwały stan zapalny był wywoływany po uprzednim specyficznym zahamowaniu aktywności cyklooksygenaz. W praktyce medycznej niesteroidowe leki przeciwzapalne są aplikowane na ogół w warunkach już istniejącego, często długo trwającego stanu zapalnego. Czy podanie inhibitorów COX dopiero po wywołaniu stanu zapalnego może wywołać odmienne reakcje układów monoaminergicznych i aminokwasowych w strukturach mózgu?

II.2. Opracowanie w języku polskim

Wprowadzenie. Na czterech stronach tekstu Doktorant w zwięzły sposób przedstawia kluczowe elementy problematyki naukowej stanowiącej merytoryczną podstawę podjętych badań własnych. Wychodząc od kluczowego dla funkcjonowania i przeżycia organizmu zjawiska homeostazy, podkreśla znaczenie, jakie dla jej utrzymania ma skoordynowane współdziałanie układów nerwowego, odpornościowego i endokrynnego. Wskazuje na konsekwencje pobudzenia układu immunologicznego w postaci m.in. indukcji stanu zapalnego towarzyszącego nasilonej syntezie prostaglandyny E2, hormonu, którego spektrum działania fizjologicznego obejmuje również oddziaływanie na ośrodkowy układ nerwowy, w tym na regulowaną centralnie indukcję zachowań chorobowych. Odnosząc się do mechanizmów zaangażowanych w walce organizmu z infekcją, zwraca uwagę na znaczenie, jakie w procesie tym odgrywa indukcja gorączki, a także podkreśla udział prostaglandyny E2, syntetyzowanej w śródbłonku naczyń włosowatych mózgu, w uruchamianiu procesu gorączkowego charakterystycznego dla stanu zapalenia. Mając na uwadze rolę prostaglandyny E2 w modulacji funkcjonowania układu odpornościowego Doktorant odnotowuje jej zaangażowanie w aktywację układu podwzgórze-przysadka-nadnercza, czego finalnym skutkiem jest nasilona synteza i uwalnianie glikokortykoidów do krwi, co w konsekwencji prowadzi do zahamowania aktywności komórek odpornościowych. Dalsza część tekstu odnosi się do funkcjonalnego związku między układem nerwowym a odpornościowym i dotyczy humoralnej drogi komunikacji odbywającej się przez zwrotne oddziaływania regulatorowe obu systemów. Następny fragment dotyczy nerwu błędnego, jako najważniejszego elementu drogi neuronalnej odpowiedzialnej za przekazywanie informacji

czuciowych z narządów obwodowych do mózgu, w tym informacji o pobudzonym układzie immunologicznym. Część końcowa rozdziału „Wprowadzenie” poświęcona jest aktywności cyklooksygenaz 1 i 2 (COX-1, COX-2) w strukturach ośrodkowego układu nerwowego z uwzględnieniem fizjologicznych skutków stosowania ich selektywnych inhibitorów w leczeniu bólu i stanów zapalnych.

Rozdział „Wprowadzenie” powstał z wykorzystaniem 32 publikacji, z których 11 stanowią prace opublikowane w ostatnich pięciu latach (2018-2022). Choć jest krótką, syntetyczną prezentacją merytorycznego tła rozprawy, to tekst przekonująco uzasadnia wybór podjętej tematyki badawczej, a wraz z opublikowanym artykułem przeglądowym Doktoranta, świadczy o jego wszechstronnej znajomości bieżącego piśmiennictwa specjalistycznego.

Cel rozprawy. Rozdział rozpoczyna się akapitem, który w skondensowanej formie informuje o tych aspektach fizjologicznej aktywności cząsteczki prostaglandyny-2, które były kluczowe przy planowaniu eksperymentów w ramach badań własnych. Następnie zawiera sformułowaną hipotezę badawczą oraz służące do jej weryfikacji cele badawcze, z których wyodrębniony został jeden cel główny oraz cztery cele szczegółowe. Rozdział kończy się informacją o celach/hipotezach badawczych w kontekście ich realizacji/weryfikacji w poszczególnych pracach (publikacji i manuskrypcie) zgłoszonych jako część rozprawy doktorskiej.

Uwagi.

1. Doktorant nie ustrzegł się niepotrzebnych powtórzeń dotyczących sformułowanych celów badań, co wpłynęło na klarowność tekstu tego rozdziału. W ostatnim zdaniu akapitu wstępnego znajduje się informacja o głównym celu pracy: *„(...) głównym celem pracy było sprawdzenie, czy istnieją mechanizmy mogące kompensować ograniczenie syntezy PGE2 po długotrwałym hamowaniu aktywności cyklooksygenaz”*, po czym, kilka linijek dalej, cel główny badań jest ponownie podany w brzmieniu: *„określenie czy długotrwałe hamowanie aktywności humoralnej drogi komunikacji nerwowo-odpornościowej doprowadzi do uruchomienia potencjalnych mechanizmów kompensujących jej zaburzenie oraz ustalenie ich charakteru”* Także zbędnym fragmentem rozdziału jest jego końcowa część, w której Doktorant, po raz kolejny, omawia cele badań, tym razem przypisując je specyficznie do konkretnych pracy. Wszystkie podawane w tym miejscu informacje są już zawarte w publikacji i manuskrypcie, do których czytelnik rozprawy ma bezpośredni dostęp.

Materiał i metody badawcze. Opis zastosowanych procedur doświadczalnych i metod analitycznych jest mniej szczegółowy w porównaniu z opisem metodyki zamieszczonej w publikacji i manuskrypcie. Jednak mimo zwięzłej formy, rozdział dostarcza najważniejszych informacji o wykorzystanych w badaniach zwierzętach, przeprowadzonych procedurach

doświadczalnych, zastosowanych technik analitycznych (chromatografii wysokociśnieniowej, testu ELISA, testu RIA) oraz o procedurze badań behawioralnych, a w tekście znajdują się odwołania do dwóch prac własnych, zawierających poszerzone już opisy metodyczne. Zaslugującym na podkreślenie jest zamieszczony na końcu rozdziału precyzyjny opis zastosowanych metod statystycznych.

Uwagi i pytania.

1. Aby zrealizować założone cele badawcze, kluczowym wymogiem eksperymentalnym podczas planowaniu doświadczenia było zapewnienie skutecznego zahamowania endogennej aktywności cyklooksygenaz. Na jakiej podstawie dokonano wyboru dawek inhibitorów COX-1 i COX-2 podanych zwierzętom; czy zostały one ustalone na podstawie wcześniejszych badań własnych zespołu, czy wybrano je na podstawie danych piśmiennictwa? Takiej informacji nie znalazłam ani w załączonych pracach ani w opracowaniu w języku polskim.
2. Jaka była czułość zastosowanych metod (ELISA, RIA) oznaczania stężenia cytokin prozapalnych i kortykosteronu w osoczu krwi?

Omówienie wyników. Szerokie spektrum uzyskanych danych eksperymentalnych stanowiło niewątpliwe wyzwanie w aspekcie ich merytorycznej interpretacji na tle aktualnego piśmiennictwa specjalistycznego. Z tym zadaniem Doktorant poradził sobie bardzo dobrze przygotowując starannie przemyślane, podzielone na kilkanaście podrozdziałów, 24 stronicowe oryginalne opracowanie naukowe. Dzięki strukturyzacji tekstu logicznie uporządkował bogaty zbiór danych dotyczący zmian jakie pojawiły się w centralnym układzie nerwowym i w osoczu w stanie aseptycznym i septycznym bez i w obecności inhibitorów COX-1 i COX-2 oraz zmian w profilu zachowań zwierząt, czym ułatwił konfrontację danych własnych z badaniami pochodzącymi z innych ośrodków. Na podkreślenie zasługuje wprowadzona modyfikacja sposobu prezentacji danych w części dotyczącej transmisji aminokwasowej. Zamiast opisu zmian stężenia każdego analizowanego aminokwasu w poszczególnych strukturach, jak miało to miejsce przy opisie zmian w transmisji monoaminergicznej, zaproponował opis oparty na charakterystyce aminokwasowej każdej z pięciu badanych struktur mózgowych. Taki zabieg prezentacyjny wydatnie zwiększył klarowność tekstu tego rozdziału. Doktorant wnikliwie i wszechstronnie zinterpretował otrzymane wyniki i mając na względzie także behawioralny aspekt swych badań, umiejętnie i z rozważą powiązał potencjalne, fizjologiczne znaczenie różnic, jakie ujawniły się na poziomie ośrodkowym ze zmianami zaobserwowanymi we wzorze zachowania zwierząt. Dobra znajomość piśmiennictwa specjalistycznego nie pozwoliła Doktorantowi na zaniechanie niezbędnej w dyskusjach naukowych ostrożności interpretacyjnej. Przytaczając i komentując także te obserwacje z innych ośrodków, które nie współgrają z danymi

własnymi, Doktorant dowodzi swej dojrzałości naukowej. Mimo zauważonych i wskazanych w uwagach do tego rozdziału pewnych nieścisłości w tekście, warto podkreślić wysoki i wyrównany naukowy poziom tej części rozprawy. Podsumowując, rozdział „Omówienie wyników” przekonująco dowodzi kompetencji Doktoranta w zakresie twórczej pracy koncepcyjnej.

Uwagi i pytania

1. Na stronie 39 Doktorant podaje, że *“(.) wpływ NPLZ na istotę szarą okołowodociagową może prowadzić do zwiększenia stężenia prolaktyny w podwzgórzu...”*. Są wprowadzone nieliczne doniesienia o ekspresji mRNA i białka prolaktyny w niektórych jądrach podwzgórza (Torner 2016, Front Endocrinol, 7:25), jednak prolaktyna to przysadkowy hormon białkowy, który jest syntetyzowany i uwalniany z komórek laktotropowych zlokalizowanych w przednim płacie przysadki. W zacytowanym fragmencie nie ma odniesienia do publikacji, która wspierałaby powyższe stwierdzenie Doktoranta, dlatego proszę o komentarz.

2. Na stronie 19 pojawia się stwierdzenie, że *„w pniu mózgu w przypadku hamowania aktywności COX-1-1 dochodziło do wzrostu stężenia noradrenaliny lecz jedynie w warunkach niesepetycznych”*. Jednakże, obraz zmian zaprezentowany na rysunku 4 w publikacji nie potwierdza takiego wzrostu, a raczej wskazuje, że stężenie noradrenaliny w grupie NaCl+SC560 jest jednak niższe niż w grupie CNT+NaCl.

3. W podrozdziale 4.5.6. dotyczącym istoty szarej okołowodociagowej : pojawiły się następujące nieścisłości:

(i) Na stronie 36/37, informacja *„zwierzęta, u których indukowano stan zapalny podczas hamowania COX-1 charakteryzowały się wyższym stężeniem glutaminianu niż te, które otrzymywały sam inhibitor. Ponadto, zwierzęta „zdrowe” otrzymujące celekoksyb wykazywały niższe stężenie glutaminianu niż osobniki przyjmujące SC560.”* nie jest w zgodzie z różnicami wskazanymi na rysunku w manuskrypcie. Zaznaczone tam różnice obejmują grupy CNT+NaCl vs CEL+NaCl i dotyczą wzrostu stężenia glutaminianu u zwierząt aseptycznych z zahamowaną aktywnością COX-2 a nie COX-1, oraz grupy CNT+NaCl vs CEL+NaCl i dotyczą spadku stężenia tego aminokwasu u zwierząt aseptycznych z zahamowaną aktywnością COX-1. Sprawę dodatkowo gmatwa fakt, że w tabeli istotności porównanie grup CNT+NaCl vs CEL+NaCl nie wykazało istotności statystycznej, a na rysunku istotność taka jest zaznaczona.

(ii) na stronie 38 informacja, że: *„Długotrwałe hamowanie aktywności COX-2 u zwierząt „zdrowych” prowadzi do zwiększenia stężenia glicyny”* jest niezgodna z rysunkiem oraz tabelą istotności, które w tej strukturze mózgu nie wykazują żadnych różnic statystycznych pomiędzy grupami.

Wnioski. Ta część rozprawy jest przedstawiona w postaci jedenastu wyodrębnionych (nienumerowanych) krótkich akapitów, w których Doktorant zrekapitulował swoje obserwacje badawcze. W obecnej formie tekst nie jest przekonujący ze względu na pojawiający w nim brak precyzji sformułowań, a także obecność stwierdzeń, które dotyczą czynników, nie będących przedmiotem własnych badań Doktoranta.

Zamieszczenie tak szczegółowych wniosków w podsumowaniu opracowania nie jest, co do zasady, błędem, jednak w przypadku ocenianej rozprawy odczuwa się brak finalnego, odnoszącego się do hipotezy badawczej, syntetycznego spojrzenia na otrzymane wyniki.

Uwagi.

1 (i) Wniosek 2 odnoszący się do układu dopaminergicznego nie informuje jakich zwierząt dotyczy wzrost aktywności po inhibicji cyklooksygenaz. Informacje takie są natomiast we wnioskach 1 i 3 odnoszących się, odpowiednio do układu noradrenergicznego (zwierzęta w stanie zapalnym) i serotonergicznego (zwierzęta w stanie niezapalnym). (ii) Dla precyzji wniosku 2 ważne jest, aby zawierał wyraźne stwierdzenie czy blokowanie aktywności cyklooksygenaz dotyczy każdej z nich. (iii) W sytuacji, gdy wniosek dotyczy zmian w hipokampie i przysłankowej korze przedczołowej, zbędne jest wprowadzanie do jego treści dodatkowego terminu „kresomózgowie”.

2. We wniosku 4 brak jest uściślającej go informacji, że efekt celekoksylu powodujący wzrost aktywności lokomotorycznej dotyczy zwierząt w stanie zapalnym. Ponadto, skoro wniosek odnosi się do aktywności lokomotorycznej jako całości to niepotrzebne jest wymienianie jej składowych.

3. Wniosek 5 zawiera stwierdzenia nie oparte na wynikach badań własnych. Dotyczy to podanego wyjaśnienia powodu unikania zapachu chorych zwierząt, jakim jest obecność w ich moczu specyficznych białek łatwo identyfikowanych na drodze węchowej przez zwierzęta zdrowe. Niezrozumiałe jest też sformułowanie „potencjalne zaburzenie homeostazy”. Jeżeli zwierzę jest chore, to zaburzenie homeostazy nie jest potencjalne lecz faktyczne.

4. Wniosek 6. *„długotrwałe podawanie zwierzętom celekoksylu aktywuje ciała migdałowate, lecz nie w ten sam sposób w jaki dochodzi do ich pobudzenia w odpowiedzi na stres ostry. Wzrost stężenia asparaginianu w obrębie tych struktur może być związany z oddziaływaniem na organizm stresu przewlekłego”* jest niezrozumiałą. O jakich sposobach aktywacji ciał migdałowatych jest mowa? U jakich zwierząt wystąpił wzmiankowany efekt celekoksylu? Dlaczego pojawiają się w tym wniosku pojęcia „stresu ostrego” i „stresu przewlekłego”?

5. We wniosku 8 podana jest informacja, że spadek zawartości glutaminianu w podwzgórzu może wpłynąć na obniżenie pobierania pokarmu ze środowiska. Jednak badania Doktoranta nie obejmowały śledzenia dynamiki zmian pobierania pokarmu.

6. Także we wnioskach 9 i 11 pojawiają się, nie wynikające z badań własnych, stwierdzenia dotyczące roli GABA i glicyny w regulacji *sickness behaviour* (wniosek 9) oraz roli asparaginanu w regulacji somatycznych reakcji obronnych oraz odpowiedzi nocyceptywnej (wniosek 11).

Streszczenie (jęz. polski)/Abstrakt (jęz. ang.). Oba rozdziały zostały przygotowane zgodnie z kanonem opracowania tego typu tekstu naukowego i zawierają syntetycznie ujęte informacje o założeniach badawczych, celu badań materiałach i metodach, wynikach oraz wnioskach.

Bibliografia. Spis literatury zawiera 108 pozycji, spośród których 59 to prace opublikowane w ostatnich 10 latach (od 2013 roku), w tym 29 ukazało się w ostatnich 5 latach (od 2018 roku).

Uwagi.

1. Bibliografia nie odzwierciedla rzeczywistej liczby prac zacytowanych w tekście opracowania, gdyż w wykazie brak jest następujących pozycji: Alix et al., 2010 cyt. s. 10; Benarroch 2011, cyt. s. 28; Dalangin et al, 2020, cyt. s.27 i inne.; Fitzgerald and Dinan, 2008, cyt. s. 30; Li et al., 2014, cyt. s. 39; Lisboa et al., 2017, cyt. s. 38; Johanson et al., 2006 cyt. s. 40; Usiello et al., 2020 cyt. s. 27.

III. Podsumowanie

Przedstawiona do oceny rozprawa stanowi kompleksowo zaprojektowane, oryginalne dzieło naukowe, którego powstanie wymagało od Doktoranta dogłębnej wiedzy w zakresie teoretycznych podstaw swoich badań, nabycia umiejętności formułowania celów i zadań badawczych, biegłości w posługiwaniu się nowoczesnymi technikami analitycznymi, a także wykazania się zdolnością do opracowania i przygotowania do druku publikacji naukowej.

W mojej ocenie bardzo wartościowym naukowo walorem pracy jest taka konstrukcja badań, w której kompleksowo analizowane zmiany aktywności układów monoaminergicznych i aminokwasowych są, *implicite*, podporządkowane głównej osi poznawczej, jaką jest wyjaśnienie neuralnych podstaw zachowań w chorobie u zwierząt w stanach zapalnych. Dzięki dwukrotnemu wykonaniu identycznych w układzie ostrych eksperymentów na zwierzętach, Doktorant mógł wiarygodnie powiązać zmiany aktywności aminokwasów neurotransmisyjnych z zachowaniem zwierząt, które w rzeczywistości było badane tylko w doświadczeniu poświęconym aktywności monoaminergicznej. Ujawniony w badaniach zmienny profil aktywności aminokwasów neurotransmisyjnych w strukturach mózgu, będących,

w przeciwieństwie do aktywności układów monoaminegricznych, wciąż o wiele mniej poznanymi, uważam za wyróżniające osiągnięcie badawcze Doktoranta. Równie istotnym osiągnięciem są oryginalne wyniki wskazujące, że wyłączenie humoralnej ścieżki komunikacji odpornościowo-nerwowej nie powoduje zahamowania komunikacji między układami, a informacja o stanie zapalnym dociera do mózgu dzięki mechanizmom kompensującym.

Zgłoszone przeze mnie uwagi krytyczne do rozprawy dotyczą zauważonych nieścisłości oraz niedociągnięć edytorskich w tekście pracy. Uwagi te traktuję jako wskazówki dla Doktoranta do wykorzystania w dalszej pracy naukowej i nie wpływają one na moją ogólną wysoką ocenę omawianego dzieła naukowego.

Wnioskując na podstawie przekazanej mi do oceny rozprawy doktorskiej oceniam, że Pan mgr Paweł Napora jest w pełni merytorycznie przygotowany do samodzielnej pracy naukowej.

IV. Wniosek końcowy

Oryginalne wyniki badań własnych Pana mgr Pawła Napory zawarte są w pracy opublikowanej w czasopiśmie indeksowanym w bazie Web of Science Core Collection oraz w manuskrypcie złożonym do tego czasopisma. Do publikacyjnej części rozprawy należy też artykuł przeglądowy w recenzowanym czasopiśmie naukowym. Uwzględniając wymóg dokonania oceny indywidualnego wkładu Doktoranta w powstaniu tych prac, po zapoznaniu się z pisemnymi oświadczeniami złożonymi przez wszystkich współautorów każdej z nich, w których jednoznacznie potwierdzają oni wiodący udział Doktoranta przy planowaniu i wykonaniu pracy eksperymentalnej oraz całościowym opracowaniu otrzymanych wyników i przygotowaniu publikacji do druku oceniam, że indywidualny, twórczy wkład Pana mgr Pawła Napory w zakresie wykonanej pracy koncepcyjnej, eksperymentalnej i edytorskiej jest wystarczający do uznania go za Autora przedłożonej rozprawy doktorskiej.

Reasumując pragnę stwierdzić, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska zatytułowana: **„Kompensacja komunikacji nerwowo-odpornościowej po zahamowaniu aktywności cyklooksyzgenaz”** spełnia wszystkie wymagania stawiane rozprawom doktorskim określone w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1668 ze zm.)

W związku z powyższym, zwracam się do Wysokiej Komisji Uniwersytetu Łódzkiego d/s Stopni Naukowych w dyscyplinie nauki biologiczne z prośbą o dopuszczenie Pana mgr Pawła Napory do dalszych etapów postępowania doktorskiego, jak też z wnioskiem o wyróżnienie rozprawy.

V. Uzasadnienie wniosku o wyróżnienie rozprawy

Pan mgr Paweł Napora przedstawił obszerne, nowatorskie dane dotyczące centralnej i behawioralnej reakcji organizmu na indukowany stan zapalny w warunkach selektywnej inhibicji cyklooksygenazy 1 i 2. Wykazał, że prostaglandyna 2 reguluje aktywność monoaminergicznych i aminokwasowych układów neurotransmisyjnych w wybranych strukturach mózgu, jednak zahamowanie jej aktywności nie hamuje centralnego odbioru sygnału o obwodowym zapaleniu, co wskazuje na uruchomieniu mechanizmów kompensujących brak aktywnej drogi humoralnej. Wykazał też, że zmieniona w stanie zapalnym aktywność układów monoaminergicznych i aminokwasowych w wybranych strukturach mózgu wiąże się z pojawieniem charakterystycznych u zwierząt zachowań w chorobie.

Obiektywnym wyrazem uznania naukowego znaczenia uzyskanych wyników, skutkującym wprowadzeniem ich do obiegu naukowego, jest ukazanie się części badań Doktoranta w czasopiśmie specjalistycznym (Behavioural Brain Research) o precyzyjnie zdefiniowanym profilu publikacyjnym, skoncentrowanym na tematyce dotyczącej centralnych mechanizmów rządzących zachowaniem. Wnioskując o wyróżnienie rozprawy Pana mgr Pawła Napory, pragnę też zwrócić uwagę na znaczenie tego typu badań w szeroko pojętej profilaktyce zdrowotnej. Choć wyniki nie mają bezpośredniego przełożenia praktycznego, to w kontekście zagrożeń związanych z niekontrolowanym używaniem przez ludzi niesteroidowych leków przeciwzapalnych, wiedza o możliwych konsekwencjach ich nadmiernego zażywania staje się kluczowa. W tym aspekcie, wyniki prac Doktoranta stanowią istotny wkład w zrozumieniu skutków jakie te substancje mogą wywołać w ośrodkowym układzie nerwowym.

Zatem, uwzględniając wnikliwie przemyślaną koncepcję badań prowadzącą do wyłonienia wyników o wysokiej wartości poznawczej, fakt ich akceptacji w renomowanym czasopiśmie specjalistycznym, a także kompetencje Autora w ich opracowaniu, z pełnym przekonaniem wnioskuję o wyróżnienie rozprawy.



Prof. dr hab. Alina Gajewska