

Prof. dr hab. n. med. Tomasz Trojanowski
Katedra i Klinika Neurochirurgii i Neurochirurgii Dziecięcej
Uniwersytet Medyczny w Lublinie

RECENZJA

rozprawy na stopień doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu
w dyscyplinie nauki medyczne mgr biol. Łukasza Przykazy
p.t. Potencjał neuroprotekcyny specyficznego agonisty receptora Y2 neuropeptydu Y w udarze
niedokrwiennym mózgu u szczurów normotensyjnych i szczurów z genetycznie
uwarunkowanym nadciśnieniem tętniczym SHR
Promotorem doktoratu jest prof. dr hab. n. med. Ewa Koźniewska-Kołodziejaska
(Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego Polskiej Akademii Nauk),
a promotorem pomocniczym dr hab. n. med. Helena Domin
(Instytut Farmakologii im. J. Maja Polskiej Akademii Nauk)

Przedmiotem rozprawy doktorskiej mgr biol. Łukasza Przykazy jest wysoce aktualny, zarówno poznawczo jak i klinicznie, problem skutecznego leczenia udaru niedokrwiennego mózgu.

W ostatnich latach obserwowany jest wzrost częstości występowania udaru niedokrwiennego mózgu wraz z wydłużaniem czasu życia populacji. Pojawienie się skuteczniejszych sposobów leczenia ostrej fazy niedokrwienia zmniejsza śmiertelność co wiąże się ze wzrostem liczby chorych z ciężkimi zaburzeniami neurologicznymi, którzy stanowią poważne obciążenie dla systemu ochrony zdrowia, społeczeństwa i najbliższego otoczenia. Wiadomo, że ponad połowa osób, które przeżyły ostrą fazę udaru pozostaje niepełnosprawnymi w stopniu znacznie utrudniającym wykonywanie codziennych czynności. Dlatego ważne jest poszukiwanie metod ochrony mózgu przed niedokrwiennym uszkodzeniem u chorych u których skutecznie i szybko udroźniono zamknięte zakrzepem naczynie.

W doświadczeniach na zwierzętach uzyskano wiele korzystnych wyników zastosowania neuroprotekcji po epizodzie niedokrwienia ale dotychczas nie uzyskano sukcesu przy próbach wykorzystania tych osiągnięć w leczeniu chorych z udarem niedokrwiennym mózgu. We wspomnianych badaniach doświadczalnych duży udział ma zespół kierowany przez prof. Ewę Koźniewską-Kołodziejczyk w IMDiK. Liczne obserwacje zespołu pozwoliły na lepsze zrozumienie zjawisk zachodzących podczas ostrego niedokrwienia mózgu i reperfuzji oraz

zwrócenie uwagi na fizjologiczne mechanizmy ochrony komórek w strefie półcienia wokół ogniska martwicy niedokrwiennej. Komórki w ognisku niedokrwienia ulegają nieodwracalnemu uszkodzeniu w krótkim czasie, do kilku-kilkudziesięciu minut od wystąpienia niedokrwienia, natomiast proces ten w strefie półcienia rozwija się wolniej. Stwarza to możliwość podjęcia działań zatrzymujących ten proces i zmniejszających stopień nieodwracalnych zaburzeń neurologicznych. Doktorant postanowił zbadać możliwość wykorzystania w tym celu naturalnych endogennych procesów ochronnych i naprawczych występujących po udarze niedokrwinnym mózgu. Zwrócił uwagę na rolę kotransmiterów i neuromodulatorów pełnioną przez neuropeptydy. Pobudzenie zwiększa nasilenie procesów prowadzących do śmierci komórek mózgu po niedokrwieniu. Z badań wiadomo, że aktywacja receptorów neuropeptydu Y2 (Y2R) zmniejsza uwalnianie neuroprzekaźników pobudzających i mediujących ekscytotoksyczność.

Praca doktorska przedstawiona do recenzji jest starannie opracowanym i oprawionym wydrukiem komputerowym. Zawiera 103 strony z doskonale edytowanym tekstem, ilustrowanym 29 kolorowymi rycinami i zawierającym 9 tabel.

Na wstępie Autor wskazuje, że wyniki badań zawarte w pracy doktorskiej były już częściowo opublikowane w formie 2 oryginalnych prac w renomowanych czasopismach: *Neuroscience* i *Translational Stroke Research* oraz w formie plakatu na międzynarodowej konferencji naukowej w Vancouver w Kanadzie.

Praca ma układ cechujący się dużą przejrzystością. Ma to szczególne znaczenie przy rozprawach zawierających zarówno obszerną część teoretyczną jak i opis wielu złożonych technik badawczych i wyników wielostronnych badań.

W pracy wyróżnia się 8 głównych rozdziałów, typowych dla obszernych rozpraw naukowych, uzupełnionych o streszczenie w języku polskim i angielskim, spis treści i listę skrótów. Układ, kolejność oraz proporcje rozdziałów są wzorowe, zgodne z zasadami przyjętymi w redagowaniu prac naukowych, a podział na odpowiednio dobrane pod względem treści i rozmiarów części znacznie ułatwia czytanie pracy oraz odnajdywanie interesujących czytelnika odniesień w poszczególnych rozdziałach. Treść pracy oraz jej poszczególnych rozdziałów jest zgodna z ich tytułami. Układ pracy cechuje przejrzysta logika, treść kolejnych rozdziałów wynika z treści rozdziałów poprzednich i jest ich rozwinięciem. Na początku rozprawy umieszczony został bardzo przydatny alfabetyczny spis używanych w niej skrótów, których użycie w treści rozprawy sprzyja zachowaniu jej redakcyjnej zwartości.

We „Wstępie” Doktorant rzeczowo i w zwarty sposób przedstawił kliniczne i epidemiologiczne aspekty udaru niedokrwinnego mózgu oraz szczegółowo bogactwo mechanizmów patologicznych i reakcji naprawczych uszkodzeń wywoływanych przez

niedokrwienie w oparciu o badania doświadczalne. Wykazał przy tym bardzo szeroką i usystematyzowaną wiedzę w zakresie bardzo złożonych mechanizmów występujących w mózgu po ogniskowym niedokrwieniu a także w warunkach powrotu krążenia. Przedstawia poznane mechanizmy uszkodzenia jednostki nerwowo-naczyniowej w obszarze niedokrwienia mózgu, szczegółowo omawiając procesy ekscytotoksyczności, depolaryzacji i procesów zapalnych, szczególnie w obszarze półcienia wokół ogniska zawału. Zwraca uwagę na fizjologicznie występujące mechanizmy ochronne i naprawcze w tej strefie w ostrej fazie niedokrwienia oraz możliwości ich modyfikacji. Rozważania teoretyczne o endogennych mechanizmach ochronnych mózgu w obszarach niedokrwienia pozwalają na wskazanie cyklicznego adenozymonofosforanu (cAMP) jako czynnika wpływającego na rozwój uszkodzeń niedokrwieniowych zarówno mięszu mózgu jak i naczyń. Znalezienie sposobu na obniżenie wzrostu poziomu wewnątrzkomórkowego cAMP może hamować niekorzystne zjawiska związane z reperfuzją takie jak depolaryzacja okołozawałowa i aktywacja leukocytów prozapalnych. Obniżenie stężenia cAMP można uzyskać przy pomocy agonistów receptorów Y2R obecnych w różnych strukturach mózgu, neuronach, astrocytach a także śródbłonku naczyń krwionośnych. Treść tego rozdziału wskazuje na doskonałą znajomość wielu aspektów klinicznych, fizjopatologicznych i molekularnych uszkodzenia mózgu w wyniku ostrego niedokrwienia. Doktorant porusza się tej tematyce z dużą swobodą, ale z zachowaniem właściwej ostrożności i krytycyzmu naukowego. Należy podkreślić wielką erudycję Doktoranta i umiejętność przejrzystego, wysoce dydaktycznego sposobu przedstawienia złożonych zjawisk. Powyższe rozważania pozwoliły Doktorantowi na sformułowanie klarownego celu rozprawy oraz wybór metod badawczych dla jego osiągnięcia.

Celem rozprawy jest próba zbadania mechanizmu neuroprotekcijnego działania agonisty receptora Y2 C-końcowego odcinka cząsteczki neuropeptydu Y – NPY. Wykorzystano do tego model in vivo ogniskowego niedokrwienia mózgu z reperfuzją u szczurów normotensyjnych i szczurów z genetycznie uwarunkowanym nadciśnieniem tętniczym.

Badano wpływ NPY(13-36) podanego do komory bocznej mózgu 30 minut po wystąpieniu niedokrwienia oraz 30 minut po reperfuzji na wielkość uszkodzonego obszaru mózgu, a także na zaburzenia chodu i spontaniczną aktywność ruchową badanych zwierząt. Badania objęły także ocenę sprawności autoregulacji przy pomocy pomiaru zmian mikroprzepływu krwi w strefie półcienia pod wpływem wzrostu ciśnienia parcjalnego CO₂ we krwi tętniczej i inhibitora syntazy tlenku azotu. Ponieważ wiadomo że w obszarze niedokrwienia i reperfuzji zmienia się gęstość naczyń mikrokrążenia i szczelność bariery krew-mózg w naczyniach włosowatych, Doktorant zbadał również te zjawiska wykorzystując bardzo zaawansowane metody doświadczalne.

Doktorant swobodnie posługuje się szeroką gamą metod badawczych i właściwie je dobierając potrafi uzyskiwać odpowiedź na najbardziej precyzyjnie zdefiniowane zadania.

W rozdziale Materiały i Metody wzorowo zostały przedstawione metody zarówno wywoływania miejscowego niedokrwienia jak i zaplanowanych badań mózgu pod względem zaburzeń przepływu, szczelności bariery krew-mózg, reaktywności układu naczyniowego a także wpływu powstania ogniska niedokrwienia mózgu na zachowanie zwierząt doświadczalnych. Zastosowane właściwie dobrane, precyzyjne metody badawcze i ich szczegółowy opis może stanowić wzór dla opracowań naukowych. Imponuje kompleksowość badań zjawisk występujących w ostrej fazie modelowego ogniskowego niedokrwienia mózgu. Potwierdza to głęboką znajomość problematyki zaburzeń mózgowego przepływu krwi oraz doświadczenie ośrodka w prowadzeniu badań nad wieloma aspektami zjawisk związanych z niedokrwieniem.

Wyniki badań zostały przedstawione przejrzysto, jednoznacznym językiem i zilustrowane dobrze zredagowanymi tabelami i wykresami a także ocenione dobrze dobranymi metodami statystycznymi. Wynikom każdego szczegółowego badania poświęcono osobny podrozdział. W kolejnym rozdziale wyniki zostały omówione i przeanalizowane na tle bardzo bogatego, dobrze dobranego piśmiennictwa.

Doktorant z wielką rozwagą i ostrożnością podszedł do interpretacji własnych badań, wykazując się w tym zakresie dużą dojrzałością i potwierdzając znajomość istoty analizowanych procesów. Imponuje wszechstronność wiedzy Doktoranta oraz umiejętność wiązania różnych danych w spójne koncepcje. Pozwoliło to na precyzyjnie sformułowanie wniosków, wynikających z wyników przeprowadzonych badań i ich analizy. W rozdziale 6. Doktorant dokonuje zwięzłego podsumowania wyników porządkującym wielokierunkowe badania w paragrafy odpowiadające na poszczególnym celom rozprawy. O dojrzałości badacza świadczy wysunięcie tylko 3 wniosków z olbrzymiego bogactwa wyników szeroko prowadzonych doświadczeń. Każdy z wniosków ma dużą wagę poznawczą i jest dobrze uzasadniony wynikami badań.

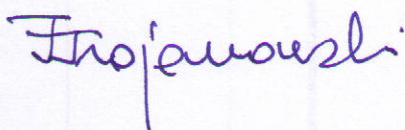
Do istotnych osiągnięć pracy należy wykazanie, że dokomorowo podany NPY(13-36) zwiększa dopływ krwi do strefy półcienia ischemicznego w czasie trwania niedokrwienia u szczurów normotensyjnych, a podany zarówno w czasie niedokrwienia jak i reperfuzji poprawia sprawność chodu u szczurów normotensyjnych i szczurów z nadciśnieniem tętniczym. Może na to korzystne działanie wpływać potwierdzona w doświadczeniach poprawa regulacji mikroprzepływu w korze mózgowej u szczurów z nadciśnieniem tętniczym oraz wzrost gęstości naczyń mikrokrążenia w strefie półcienia ischemicznego u szczurów z prawidłowym i podwyższonym ciśnieniem krwi.

Działanie to ma też odzwierciedlenie w mniejszym stopniu zaburzenia zdolności ruchowych chodu i ruchliwości u szczurów normotensyjnych i z nadciśnieniem. Powstanie ogniska niedokrwiennego upośledza zdolności ruchowe, a podanie NPY(13-36), szczególnie w czasie niedokrwienia, poprawia parametry chodu.

Doktorant wykazał, że NPY(13-36) ma działanie ochronne na niedokrwiony mózg na poziomie mikrokrążenia przez zwiększenie mikroprzepływu w korze mózgowej w strefie penumbry w czasie niedokrwienia a także powoduje zmniejszenie obszaru poniedokrwiennej martwicy mózgu u szczurów.

Wnikliwość i rozwaga z którą Doktorant odnosi się do oceny wyników swoich badań i szeroka wiedza w zakresie badań nad niedokrwieniem mózgu wskazują na Jego dobre przygotowanie do prowadzenia badań doświadczalnych i dojrzałość jako badacza, a uzyskane wyniki obok znacznej wartości poznawczej mogą stanowić podstawę do dalszych badań nad możliwościami poprawy wyników leczenia chorych z ostrym niedokrwieniem mózgu.

Właściwie dobierając temat pracy, prawidłowo formułując jej cele, dobierając odpowiedni materiał i metody badań oraz prawidłowo oceniając uzyskane wyniki mgr biol. Łukasz Przykaza dowiódł, że posiada umiejętność prowadzenia badań naukowych. Praca jest Jego oryginalnym osiągnięciem i stanowi istotny wkład do piśmiennictwa w zakresie poznawania mechanizmów pozwalających na zmniejszanie skutków niedokrwienia mózgu. Rozprawa w pełni odpowiada wymogom stawianym dysertacjom doktorskim i dlatego mam zaszczyt przedstawić Wysokiej Komisji d/s Studiów Doktoranckich i Doktoratów Rady Naukowej Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. Mirosława Mossakowskiego PAN w Warszawie wniosek o dopuszczenie mgr biol. Łukasza Przykazy do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Praca zasługuje na wyróżnienie.



Prof. dr hab. n. med. Tomasz Trojanowski

Lublin 24. 09. 2022 r