



Poznań, 22.05.2022

Dr hab. Małgorzata Słocińska, prof. UAM
Zakład Fizjologii i Biologii Rozwoju Zwierząt
Instytut Biologii Eksperymentalnej
Wydział Biologii Uniwersytetu im. A. Mickiewicza
Poznań

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Karoliny Kabzińskiej-Milewskiej
„Studia nad biologicznym znaczeniem organicznych i nieorganicznych form soli litu”**

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska mgr Karoliny Kabzińskiej-Milewskiej została wykonana w Katedrze i Zakładzie Psychologii Klinicznej pod kierunkiem dr hab. inż. Rafała Wójciaka. Celem pracy było określenie wpływu organicznej i nieorganicznej formy soli litu na wybrane procesy fizjologiczne w tym, aktywność enzymów trawiennych czy poziom metabolitów w różnych układach modelowych: *in vitro*, *in ovo*, oraz z udziałem pacjentów leczonych litem, u których zdiagnozowano zaburzenia afektywne dwubiegunowe (CHAD).

Sole litu zaliczane są do leków normotymicznych, stabilizujących nastrój, o działaniu przeciwdepresyjnym i przeciwmaniakalnym. Stosowane są z powodzeniem od ponad pół wieku w psychofarmakoterapii choroby afektywnej dwubiegunowej, która dotyka ok. 2% Polaków, jest chorobą przewlekłą i nieuleczalną. Lit w formie organicznej w postaci orotanu i asparagianu litu dostępny jest także na rynku jako suplement diety.

Mimo powszechnego stosowania soli litu w leczeniu chorób psychicznych, mechanizm jego działania nie jest dokładnie poznany, zwłaszcza aspekt długotrwałego przyjmowania leków i możliwych różnorodnych skutków ubocznych, w tym związanych z zaburzeniami metabolicznymi oraz zaburzeniami odżywiania u osób z CHAD. Dlatego wybór tematu, przybliżającego nas do poznania wpływu stosowanej powszechnie w leczeniu chorych nieorganicznej formy litu (węglanu litu), jak i organicznej formy tego pierwiastka (cytrynianu litu) na wybrane parametry fizjologiczne i metaboliczne człowieka uważam za ważny i ciekawy, a wyniki uzyskane w pracy mogą mieć potencjał aplikacyjny.

M. Słocińska



Rozprawę doktorską stanowią 4 prace, w tym 3 prace eksperymentalne opublikowane w czasopismach o zasięgu międzynarodowym i jedna praca przeglądowa w języku polskim. Sumaryczny Impact Factor przedstawionych prac wynosi 5,127, a suma punktów MEiN: 160. Oprócz prac wskazanych w dysertacji Doktorantka jest współautorem kilku innych opracowań, których tematyka dotyczy m.in wpływu mikrobioty na zachowanie człowieka czy znaczenia suplementacji probiotykami a także kilku doniesień konferencyjnych. Na początku br. w czasopiśmie *Health Psychology Report* ukazała się także oryginalna praca naukowa nie ujęta w Autoreferacie pt. „Acceptance, coping strategies and health behaviors in bipolar disorder patients taking and not taking lithium carbonate, której pani Karolina Kabzińska-Milewska jest pierwszym autorem.

Należy podkreślić, że w wszystkich ujętych w dysertacji publikacjach, Doktorantka jest pierwszym autorem oraz autorem korespondencyjnym, a oświadczenia współautorów wskazują, iż jej wkład w koncepcję, planowanie badań, wykonanie eksperymentów i pisanie manuskryptów wynosi odpowiednio 70 % dla pracy przeglądowej i 50 % dla prac eksperymentalnych.

W skład Autoreferatu, oprócz kopii wymienionych prac wchodzi także kolejno: Wykaz stosowanych skrótów, Opis aktywności naukowej doktorantki, Wstęp będący wprowadzeniem w problematykę dysertacji, z której wyłania się jasno sformułowany cel ogólny i cele szczegółowe, omówienie publikacji wchodzących w skład cyklu obejmującego dysertację, Wnioski końcowe, Piśmiennictwo na które składa się 87 pozycji literaturowych, Streszczenie w języku polskim i angielskim oraz pisemne Oświadczenia współautorów i uchwała komisji bioetycznej.

W związku z tym, że prace zostały opublikowane w czasopismach recenzowanych i poddane ocenie przez niezależnych recenzentów i specjalistów z dziedziny, którzy docenili poprawność metodologiczną przeprowadzonych eksperymentów i wartość merytoryczną otrzymanych wyników skoncentrują się jedynie na ogólnej ocenie dysertacji pani Karoliny Kabzińskiej- Milewskiej.

Głównym celem postawionym przez Doktorantkę było porównanie i oszacowanie aktywności różnych stężeń organicznej i nieorganicznej formy soli litu (cytrynianu i węgla) na wybrane procesy fizjologiczne. Badania przeprowadzono w różnych układach modelowych: *in vitro*, *in ovo* oraz z udziałem pacjentów leczonych litem. Zostały one dobrze zaplanowane, wykonane i opracowane statystycznie. Do realizacji zadań wykorzystano różnorodne techniki i metody badawcze tj. iniekcja

K. Milewska



roztworami litu zapłodnionych jaj kurzych, pomiar aktywności enzymów proteolitycznych metodą kolorymetryczną, oznaczanie węglowodanów i lipidów we krwi oraz oznaczanie zawartości składników mineralnych metodą spektrofotometryczną w materiale pobranym od pacjentów. Metody badawcze zostały dobrane prawidłowo do postawionych w dysertacji celów, a ich realizacja wskazuje na swobodne poruszanie się autorki w pracy eksperymentalnej. Należy tu podkreślić, że iniekcja zapłodnionych jaj wymaga sporej precyzji, co wskazuje na zdolności manualne Doktorantki.

Pierwszym zadaniem szczegółowym postawionym przed panią Karoliną Kabzińską-Milewską było zebranie aktualnego stanu wiedzy na temat litu i stosowania soli litu w leczeniu chorób psychicznych. Omówione zostały także kontrowersje jakie towarzyszą terapii solami litu, ze względu na potencjalne skutki uboczne, wrażliwość osobniczą na jego działanie oraz wąskie „okno terapeutyczne”. Powyższe treści zostały przedstawione w pracy przeglądowej: *Karolina Kabzińska, Dominik Czajeczny, Rafał A. Wójciak. Kontrowersje wokół pewnego normotymiku : historia litu. The controversy around a mood stabilizer: The history of lithium opublikowanej w Acta Medicorum Polonorum, Tom 8, Numer 2 (2018) s. 36-51* stanowiąc dobry punkt wyjścia do sformułowania problemów badawczych.

Drugim postawionym przez Doktorantkę szczegółowym celem badawczym było określenie wpływu soli litu w różnych stężeniach na aktywność enzymów trawiennych, pepsyny i trypsyny w warunkach *in vitro*. W badaniach jako drugą zmienną zastosowano różne proporcje substratu do enzymu. Uzyskane wyniki przedstawione w pracy: *Karolina Kabzińska, Angelika Cisek-Woźniak, Dominik Czajeczny, Kinga Mruczyk, Rafał Wójciak The influence of Li + ions on pepsin and trypsin activity in vitro. 2021, J Trace Elem Med Biol 66:126763.* potwierdzają hipotezę o wpływie litu, jako silnie reaktywnego metalu na aktywność pepsyny i trypsyny i otwierają pole do dalszych badań już w warunkach *in vivo*. Nie wiemy bowiem jaki byłby wpływ soli litu na aktywność badanych enzymów w naturalnym środowisku (odpowiednio żołądka i dwunastnicy), w którym inne czynniki tj. skład i rodzaj pokarmu, pH, obecność innych enzymów mogą znacząco wpływać na aktywność analizowanych enzymów proteolitycznych. Podkreślają to zresztą w publikacji autorzy pracy. Cenne byłoby także rozszerzenie badań o analizę aktywności innych enzymów trawiennych tj. lipaza czy amylaza trzustkowa oraz w przyszłości, analizę enzymów kluczowych dla szlaków metabolicznych lipidów i węglowodanów.

M. Milewska



Trzecim wyodrębnionym zadaniem badawczym było określenie wpływu obu form soli litu na stężenie glukozy, cholesterolu i trójglicerydów rozwijających się zarodków kurzych. Rezultaty badań opublikowano w pracy: *Karolina Kabzińska and Rafał Wojciech Wójciak, Effect of in ovo lithium carbonate and citrate injection on embryonic development and total blood glucose, triglyceride, and cholesterol concentration, 2021, Trace Elements and Electrolytes*. Cytrynian litu indukował wzrost glukozy i trójglicerydów, z kolei węglan litu powodował wzrost stężenia cholesterolu we krwi pobranej od embrionów. Autorzy zauważają, że forma organiczna litu indukowała większe zmiany badanych parametrów w porównaniu do jego formy nieorganicznej, jednocześnie nie zaobserwowano istotnego wpływu na masę embrionu. Uzyskane wyniki potwierdzają istotny udział litu w metabolizmie lipidów i węglowodanów. Na uwagę zasługuje także opracowanie układu modelowego *in ovo*, który może zostać wykorzystany w dalszych badaniach, np. dotyczących wpływu litu na rozwój zarodka.

Czwartym szczegółowym problemem badawczym było określenie wpływu terapii węglanem litu na wysycenie organizmu wybranymi składnikami mineralnymi takimi jak Cu, Fe, Zn, Mg. Przeprowadzono badania składu włosów pod kątem obecności wymienionych pierwiastków u pacjentów, u których zdiagnozowano chorobę dwubiegunową. Wyniki, które opisano w pracy: *Karolina Kabzińska-Milewska, Dominik Czajeczny, Rafał Wojciech Wójciak, Effect of lithium treatment on the content of lithium, copper, calcium, magnesium, zinc and iron in the hair of patients with bipolar disorder, 2021, Journal of Elementology, 26(4): 791-805*, wskazują, iż pacjenci, którym podawano lit posiadają we włosach wyższą średnią zawartość Li, Zn i Mg oraz niższą średnią zawartość Fe w porównaniu do pacjentów nie leczonych litem. Stwierdzono również zależności między stężeniem Li i Mg, Mg i Ca, oraz Fe i Li we włosach pobranych od osób, którym nie podawano litu. W nawiązaniu do pracy, chciałabym zapytać:

- Czy wszyscy pacjenci, od których pobierano włosy otrzymywali takie same dawki leków, co mogłoby wpływać na zawartość pierwiastków we włosach?
- Czy włosy były pobrane od każdego pacjenta tylko raz?
- Czy wyniki krwi pobranej od grupy pacjentów wskazywały na zmiany poziomu litu?
- Jak wytłumaczyć korelację wzrostu stężenia litu przy jednoczesnym wzroście stężenia magnezu?

M. Kabzińska



Podsumowując, przedstawioną do recenzji rozprawę doktorską pani mgr Karoliny Kabzińskiej-Milewskiej oceniam bardzo pozytywnie, choć *brakuje mi zamykających cykl publikacji rozważań autorki, które spinałyby wszystkie elementy dysertacji oraz pokazywały perspektywę badań nad wpływem soli litu na metabolizm zwierząt, w tym człowieka i ich dalszego potencjalnego wykorzystania w leczeniu zaburzeń psychicznych.* W trakcie realizacji pracy otrzymała ona wyniki zawierające elementy nowości naukowej i opublikowane w czasopismach naukowych o zasięgu międzynarodowym, które przybliżają nas do wyjaśnienia mechanizmów oddziaływania soli litu na organizm zwierzęcy. Praca Autorki wskazuje na jej samodzielność, pracowitość oraz ogólną i specjalistyczną wiedzę. Pewne niedociągnięcia i drobne błędy Recenzent zauważył jedynie w samym Autoreferacie, np.:

- Tytuł ostatniej pozycji został podany błędnie w Wykazie publikacji stanowiących rozprawę doktorską (str. 8)
- W opisie publikacji 3 z cyklu, na stronie 24, dawki iniekcyjne podane są w $\mu\text{g}/100\text{ ml}$ roztworu na jajo, a były podawane w $100\ \mu\text{l}$; podobnie, do jaj, które stanowiły próbę kontrolną podawano $100\ \mu\text{l}$ soli fizjologicznej, a nie 100 ml
- Pojawiają się skróty myślowe: „analizowane parametry są wrażliwe”, „analizowane wskaźniki reagowały” (str. 25)
- Dla określenia istotności zmian stosujemy określenie: „zmiany istotne statystycznie” na podstawie wyników uzyskanych w trakcie eksperymentów, zamiast nieprecyzyjnego określenia: „istotne zmiany w większej liczbie eksperymentów” (str. 28)

Powyższe uwagi nie wpływają jednak na pozytywną ocenę całości pracy doktorskiej.

Przedłożona mi do recenzji rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478, 619, 1630) zwracam się do Kapituły Kolegium Nauk o Zdrowiu UM w Poznaniu o dopuszczenia mgr. Karoliny Kabzińskiej-Milewskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.