



UNIwersytet Jagielloński
COLLEGIUM MEDICUM
W KRAKOWIE

Wydział Farmaceutyczny

Kraków, 4 kwietnia 2022 r.

O C E N A R O Z P R A W Y D O K T O R S K I E J

„Ocena neuroprotecyjnych właściwości soków z owocu granatu i żurawiny w modelu zwierzęcym choroby Parkinsona”, wykonanej przez mgr farm. Monikę Kurpik w ramach Podyplomowego Niestacjonarnego Studium Badań Naukowych Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, w Katedrze i Zakładzie Tokykologii UMP

Promotor rozprawy: Prof. dr hab. Jadwiga Jodynis-Liebert

Promotor pomocniczy: Dr hab. Małgorzata Kujawska

Przedstawiona do oceny praca Pani mgr Moniki Kurpik poświęcona jest roli soków z owoców granatu oraz żurawiny w neuroprotekcji choroby Parkinsona, indukowanej chemicznie u zwierząt doświadczalnych. Intensywne badania nad tą chorobą, jej patofizjologią, możliwą farmakoterapią oraz wpływem żywienia, zarówno w aspekcie zapobiegania, ale również zwiększania ryzyka zachorowania, prowadzone są od kilku dekad w wielu ośrodkach badawczych w kraju i za granicą. Etiologia choroby Parkinsona nie jest do końca wyjaśniona, choć znany jest już szereg mechanizmów odpowiedzialnych za jej powstawanie. Jednak rola właściwego żywienia, szczególnie w prewencji, ale też w trakcie przebiegu choroby (w różnych jej etapach) nie jest jasna. Nie ulega zatem wątpliwości, że Autorka ocenianej pracy sięgnęła po temat wyjątkowo aktualny i wartościowy pod względem merytorycznym. Cele pracy sformułowane zostały jasno. Na uwagę zasługuje również wybór materiału badanego, tj. dwóch owoców z grupy tzw. „super fruits”, czyli granatów oraz uprawianej w Polsce żurawiny.



UNIwersytet Jagielloński
COLLEGIUM MEDICUM
W KRAKOWIE

Wydział Farmaceutyczny

Wyniki przeprowadzonych badań Autorka przedstawiła w formie obszernego opracowania, obejmującego 110 stron. Praca ma układ klasyczny i jest podzielona na kilka zasadniczych części, obejmujących „Wstęp i cel pracy”, „Część doświadczalną”, opisującą przedmiot badań, układ doświadczenia, model zwierzęcy i metodykę badań, „Wyniki badań i dyskusję” oraz „Podsumowanie i wnioski”. Praca zawiera również streszczenie w języku polskim i angielskim. Piśmiennictwo obejmuje 124 pozycje, w tym 90 z ostatnich dziesięciu lat. W pracy zamieszczono 44 ryciny i tabele, które w sposób syntetyczny i czytelny dokumentują uzyskane wyniki.

Wprowadzenie do rozprawy stanowi, w większości aktualny, przegląd piśmiennictwa, składający się z kilku podrozdziałów, których treść w interesujący sposób przybliży zagadnienia związane z celem tej pracy. Autorka wnikliwie ujęła problematykę patogenezę choroby Parkinsona, z uwzględnieniem roli stresu oksydacyjnego i endogennych układów antyoksydacyjnych, mutacji w genach PINK1, Parkin, czy LRRK2, czy też udziału mikrogleju oraz astrocytów, zarówno w aspekcie neuroprotekcji, jak i neurotoksyczności. Autorka dokonała również porównania właściwości żywieniowych i farmakologicznych badanych owoców, ze szczególnym uwzględnieniem zawartości związków aktywnych, które mogą być odpowiedzialne za ocenianą aktywność neuroprotekcijną. Wskazała także na szczególną rolę urolityn, produktów rozpadu elagotanin pod wpływem flory bakteryjnej przewodu pokarmowego, posiadających możliwość przenikania przez barierę krew – mózg, co w kontekście zastosowanego modelu zwierzęcego jest bardzo istotne i wartościowe. Doktorantka scharakteryzowała także problem biodostępności związków z grupy polifenoli i możliwości ich penetracji do struktur układu nerwowego, co wskazuje na krytyczne i dojrzałe spojrzenie na ich potencjalne zastosowanie w profilaktyce chorób układu nerwowego, gdzie przechodzenie przez barierę krew-mózg jest kluczowe. Za szczególnie interesujący uważam fragment tekstu poświęcony krytycznej ocenie zastosowania rotenonowego modelu choroby Parkinsona, ze szczególnym uwzględnieniem jego przebiegu i ograniczeń dla potencjalnego badacza.



UNIwersytet Jagielloński
COLLEGIUM MEDICUM
W KRAKOWIE

Wydział Farmaceutyczny

Warto podkreślić, że Autorka dokonała również syntetycznego i interesującego omówienia systemu obrony organizmu przed wolnymi rodnikami, ze szczególnym uwzględnieniem układu nerwowego.

Uczucie pewnego niedosytu pozostawia – dostrzeżona wprawdzie przez Autorkę, i udokumentowana w tekście – różnica w składzie jakościowym owoców granatu i żurawiny, czy też zdolności antyoksydacyjnej soków z nich otrzymanych. Zestawienie tabelaryczne tych parametrów i ich ilościowa ocena ułatwiłyby czytelnikowi porównanie obu surowców, również w kontekście interpretacji uzyskanych wyników. Szkoda również, że Autorka nie porównała badanych owoców z innymi, obecnymi w codziennej diecie, a jedynie odesłała czytelnika do pracy nr 21 i 34. Wydaje się, że nawet krótkie omówienie tych aspektów mogłoby stanowić dodatkowy walor rozprawy doktorskiej.

Część poświęcona badaniom własnym zawiera rzetelny opis przygotowania zwierząt, schemat eksperymentu oraz opis procedur laboratoryjnych. W mojej opinii, w części tej brakuje dokładnej charakterystyki soków użytych w badaniu, z uwzględnieniem ich analizy jakościowej i ilościowej oraz aktywności antyoksydacyjnej. Dodatkowo, Doktorantka nie wyjaśnia, czym sugerowała się w wyborze ilości soków podawanych szczurom, dlaczego dożołądkowo podawano 200 oraz 500 mg soku/kg m.c./dzień, i czy na pewno były to mg, a nie ml?

Wyniki badań zostały przedstawione w sposób przejrzysty, w formie tabel oraz wykresów, odpowiednio opracowanych statystycznie.

Część pierwsza poświęcona jest głównie określeniu wpływu modelu oraz podawania soków na masę ciała szczurów, na wyniki testu stabilności postawy oraz analizy mikroskopowej wycinków mózgu szczurów.

W wynikach dotyczących analizy przyrostu masy ciała zwraca uwagę brak odchyłeń standardowych (tabela 1 i 23 oraz rycina 1 i 23) oraz pewna niejasność sformułowań użytych przez Doktorantkę - „W piątym tygodniu nastąpiło 105% a w 6 i 7 tygodniu 3-krotne obniżenie przy-



UNIwersytet Jagielloński
COLLEGIUM MEDICUM
W KRAKOWIE

Wydział Farmaceutyczny

rostu masy ciała [...]”, podobnie na stronie nr 58. W wynikach dotyczących testów stabilności (tabela nr 2), Doktorantka powinna ograniczyć ilość liczb po przecinku do wartości znaczących ($6,233 \pm 0,227$?) uwaga ta dotyczy też m.in. tabeli nr 3, 6, czy 13.

Druga część wyników opisuje wpływ modelu oraz podanych soków na aktywność wybranych enzymów oraz ekspresję białek związanych z apoptozą. W wynikach (rycina 21, 22, 33, 34) dotyczących poziomu ekspresji białek pro i anty-apoptotycznych (Bax i BCl-xl) opis osi Y tych rycin jest niejasny i lakoniczny. Dobrym uzupełnieniem wyników ilościowych byłoby również przedstawienie uzyskanych blotów.

Pomimo tych uchybień uważam, że wyniki badań obu części eksperymentu zostały prawidłowo omówione i zilustrowane.

Na uwagę zasługuje dogłębnie wykonana ocena statystyczna, którą przeprowadzono w oparciu o standardowe testy statystyczne. Interpretacja tak opracowanych wyników nie budzi zastrzeżeń, chociaż ponownie warto byłoby zestawzić otrzymane dla dwóch różnych owoców wyniki, tak aby w sposób przejrzysty ocenić, który z nich wykazywał skuteczniejszą aktywność neuroprotekcijną.

Badania wykazały, że podanie obu soków ograniczało spadek przyrostu masy ciała szczurów wywołany przez rotenon. Dodatkowo, na podstawie testów behawioralnych i histopatologicznych wykazano odpowiednio zmniejszenie zaburzeń związanych ze stabilnością postawy oraz zmniejszenie stopnia degeneracji neuronów śródmózgowia.

Obie dawki soku z granatów wpłynęły znacząco na obniżenie stopnia peroksydacji lipidów, wywołanej działaniem rotenonu, zmniejszając stężenie aldehydu malonowego w korze mózgowej. Odnotowano ponad 2-krotny wzrost stężenia zredukowanego glutationu oraz aktywności ALDH2 w śródmózgowiu szczurów, otrzymujących łącznie rotenon i sok. Aktywność CAT, GPx i GST istotnie wzrosła w grupach traktowanych jednocześnie uszkodzającą substancją modelową i sokiem. Odpowiedź GR na rotenon była inna niż pozostałych enzymów.



UNIwersytet Jagielloński
COLLEGIUM MEDICUM
W KRAKOWIE

Wydział Farmaceutyczny

Zaobserwowano wzrost aktywności GR u szczurów modelowych i jej obniżenie u szczurów traktowanych łącznie sokiem i neurotoksyną, zarówno w śródmózgowiu, jak też w korze, co zostało zinterpretowane przez Doktorantkę jako mechanizm kompensacyjny. Poziom białka antyapoptotycznego Bcl-xl uległ obniżeniu o 20% pod wpływem rotenonu, natomiast sok z granatu w obu dawkach spowodował utrzymanie tego parametru na poziomie kontrolnym.

W przypadku soku z żurawiny doszło do obniżenia stężenia aldehydu malonowego w śródmózgowiu o ok. 80%. W przeciwieństwie do efektu wywołanego przez sok z granatu, sok z żurawiny nie spowodował zmian stężenia GSH w żadnej strukturze mózgu. Podawanie samego soku, niezależnie od neurotoksyny, wywarło korzystny wpływ, o czym świadczył wzrost aktywności SOD, GR i GST. W korze mózgowej aktywność wszystkich oznaczanych enzymów antyoksydacyjnych wzrosła w grupach traktowanych rotenonem i obiema dawkami soku. Poziom białka proapoptotycznego Bax wzrósł pod wpływem rotenonu i został obniżony u szczurów otrzymujących jednocześnie większą dawkę soku żurawinowego, przez co utrzymana została ekspresja tego białka na poziomie kontrolnym.

Na podstawie powyższych obserwacji Doktorantka stwierdziła neuroprotektoryjne działanie soków z granatu i żurawiny, jednak ze wskazaniem na korzystniejszy efekt tego pierwszego.

Generalnie praca napisana jest przejrzysto i z dużą znajomością przedstawianych zagadnień. Jednak oceniając ją nie sposób nie odnieść się do kilku punktów:

- Autorka podkreśla, że w przeprowadzonych eksperymentach więcej zmian parametrów stresu oksydacyjnego wywołanych rotenonem oraz łącznym podaniem rotenonu i soków zaobserwowano w śródmózgowiu niż w korze mózgowej. Jednak ta obserwacja w mojej opinii nie została w wystarczający sposób przedyskutowana i wymaga dalszego komentarza.



UNIwersytet Jagielloński
COLLEGIUM MEDICUM
W KRAKOWIE

Wydział Farmaceutyczny

- W części dotyczącej wykorzystanych metod badawczych podano opis testu do oceny poziomu tlenu azotu oraz testu ELISA do wykrywania TNF-alfa. Jednak w wynikach brak jest informacji o wartościach tych parametrów w poszczególnych grupach zwierząt. Można znaleźć jedynie jedno zdanie w dyskusji, gdzie Doktorantka pisze, że „ekspresja tych cząsteczek nie różniła się znamienne pomiędzy poszczególnymi grupami”. Takie pominięcie może nieco dziwić, zwłaszcza, że dla innych rezultatów np. poziomu białek pro i anti-apoptycznych przy podaniu soku żurawinowego obserwacje też były nieistotne statystycznie, a szczegółowe wyniki zostały jednak zaprezentowane. Dodatkowo, sformułowanie „ekspresja”, użyte przez Doktorantkę w odniesieniu do wyników testów ELISA, czy oznaczenia tlenu azotu metodą Griessa, jest błędne, gdyż testy te opierają się o inne zasady.
- Brakuje również analizy korelacji uzyskanych wyników, która byłaby wartościowym uzupełnieniem. Pomimo braku testów oceniających korelację, Doktorantka pisze w podsumowaniu i wnioskach, że „obniżenie poziomu peroksydacji lipidów i korelujący z tą zmianą wzrost aktywności dehydrogenazy aldehydowej”. Analizy takiej jednak nie dokonano, a sformułowanie należy uznać za niefortunne.

Z obowiązku recenzenta muszę również wspomnieć o drobnych uwagach krytycznych, które nasunęły się w trakcie czytania:

- w tekście brakuje bezpośredniego nawiązania do rycin, jak i tabel prezentujących wyniki
- brakuje spisu tabel i rycin, który ułatwiłby pracę z tekstem
- na stronie 13 indukowana syntaza tlenu azotu jak i cyklooksygenaza 2 nazwane zostały mediatorami stanu zapalnego, co jest określeniem niefortunnym, gdyż enzymy te powodują syntezę mediatorów zapalnych
- na stronie 14 znajduje się zdanie „w przypadku choroby Parkinsona znaczenie kluczowe mają substancje ochronne dla struktur i funkcji komórek układu nerwowego”, jednak potencjalne



UNIwersytet Jagielloński
COLLEGIUM MEDICUM
W KRAKOWIE

Wydział Farmaceutyczny

substancje o takim działaniu nie zostały wskazane przez Doktorantkę

- strona 18 „przewlekłe podawanie ROT” – co oznacza w tym kontekście słowo przewlekłe, jak długo należy stosować rotenon, aby zaobserwować uszkodzenia neuronów dopaminergicznych

- strona 25 „*helianthi oleum raffinatum*”- brak dużej litery

Tego typu drobne usterki nie zmieniają faktu, że rozprawa napisana jest przejrzysto, dobrym językiem, a stosunkowo rzadkie błędy i nieścisłości, albo miejsca wymagające korekty stylistycznej, zauważone w tekście, wynikają zapewne z przeoczeń przy pisaniu, i nie wpływają na wysoką, merytoryczną wartość pracy. Sądzę, że lista drobnych potknięć, wykazana powyżej, zostanie uwzględniona w redagowaniu materiału do druku w czasopiśmie naukowym.

Uważam, że zarówno znajomość zagadnień teoretycznych, jak i zakres badań, przeprowadzonych przez mgr Monikę Kurpik, a także sposób ich interpretacji, wskazują na dobre przygotowanie warsztatowe Doktorantki w zakresie problematyki prezentowanej w tej rozprawie. Postawione w pracy cele zostały przez Doktorantkę w pełni zrealizowane.

Podsumowując, stwierdzam, że rozprawa doktorska pani mgr Moniki Kurpik spełnia wymagania określone przepisami ustawowymi dla osób ubiegających się o stopień naukowy doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu, w dyscyplinie nauki farmaceutyczne. W związku z powyższym zwracam się do Kolegium Nauk Farmaceutycznych Uniwersytetu Medycznego im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu z wnioskiem o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie pani mgr Moniki Kurpik do dalszych etapów przewodu doktorskiego.