

dr hab. n. med. Michał Karbownik, prof. UM
Zakład Farmakologii i Toksykologii
Uniwersytet Medyczny w Łodzi
michal.karbownik@umed.lodz.pl

Łódź, 09 maja 2025 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr. Kosmy Sakrajdy

Niniejsza recenzja została przygotowana w oparciu o art. 185-217 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. 2018 poz. 1668), zwanej dalej Ustawą.

1. Uwagi wstępne

Przedmiotowa rozprawa na stopień naukowy doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauk medycznych mgr. Kosmy Sakrajdy nosi tytuł "Zmiany ekspresji markerów związanych ze stanem zapalnym w przebiegu choroby afektywnej dwubiegunowej pod wpływem węglanu litu". Została przygotowana pod kierunkiem Promotora prof. dr hab. n. med. Aleksandry Szczepankiewicz w Pracowni Badań Komórkowych i Molekularnych Kliniki Pneumonologii, Alergologii Dziecięcej i Immunologii Klinicznej Kolegium Nauk Medycznych Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu.

2. Struktura rozprawy

Rozprawę stanowi zbiór opublikowanych i powiązanych tematycznie artykułów naukowych w myśl pkt. 3 art. 187 Ustawy. Są to trzy artykuły naukowe, w tym dwa o charakterze prac oryginalnych; we wszystkich Doktorant figuruje jako pierwszy i korespondencyjny autor. Artykuły te zostały przedstawione w 82-stronicowej strukturze rozprawy doktorskiej, w której skład wchodzi – poza samymi pełnymi tekstami artykułów:

- strona tytułowa, słowa kluczowe (w języku polskim i angielskim), podziękowania, źródła finansowania, wykaz skrótów i spis treści – każda z części po 1 stronie
- wykaz publikacji stanowiących podstawę postępowania o nadanie stopnia naukowego doktora wraz z podsumowaniem całego dorobku i aktywności naukowej Doktoranta – 3 strony
- opis przedmiotu badań ze wstępem merytorycznym, założeniami rozprawy doktorskiej i omówieniem prac wchodzących w jej skład, a także wynikającymi z nich wnioskami oraz piśmiennictwem (63 pozycje literatury) i streszczeniami w języku polskim i angielskim – 24 strony
- kopie oświadczeń współautorów publikacji o ich wkładzie wraz ze zgodami na włączenie ww. publikacji do cyklu prac w postępowaniu o nadanie stopnia doktora mgr. Kosmie Sakrajdzie i oświadczeniem, że prace nie były wykorzystywane w innym przewodzie doktorskim (oprócz jednej z prac, która wskazuje na wyjątek wspólnych przewodów doktorskich) – 5 stron
- orzeczenie komisji bioetycznej o zmianie tematu pracy doktorskiej mgr. Kosmy Sakrajdy – 1 strona

3. Ocena treści rozprawy doktorskiej

Rozprawa doktorska została złożona w klasycznym stylu. Ponieważ stanowi ją zbiór opublikowanych i powiązanych tematycznie artykułów naukowych, część merytoryczna rozprawy jest krótka (wstęp – 5 stron, założenia rozprawy doktorskiej wraz z omówieniem prac wchodzących w skład cyklu – 9 stron, wnioski – 2 strony, piśmiennictwo – 4 strony, streszczenia w języku polskim i angielskim – po 2 strony każde). Jest to zrozumiałe i akceptowalne rozwiązanie, gdyż szczegóły metodologiczne, pełne przedstawienie wyników i rozbudowaną dyskusję można znaleźć w treści opublikowanych artykułów, które stanowią część rozprawy. Tekst cechuje się klarownością, poprawnością językową oraz przystępnością przekazu, w dużej większości z prawidłowym zastosowaniem terminów fachowych (razić może co najwyżej zastosowanie sformułowania „polimorfizmy genetyczne” nie tylko w odniesieniu do samego zjawiska, ale także do poszczególnych „wariantów polimorficznych genów”). Skróty są stosowane w adekwatnej ilości i wyjaśnione nie tylko w odpowiednim rozdziale, ale też w większości konsekwentnie w momencie ich pierwszego pojawienia się w treści rozprawy; skróty pochodzące z języka angielskiego dodatkowo są wyjaśnione w tym języku.

3.1. Wstęp

Wstęp teoretyczny rozprawy prowadzi w spójny sposób przez charakterystykę epidemiologiczną, kliniczną i patofizjologiczną choroby afektywnej dwubiegunowej (ChAD). Kolejny podrozdział rozwija ten ostatni wątek omawiając teorię neurozapalną ChAD. Następnie Doktorant wyjaśnia rolę mikrogleju w regulacji odpowiedzi immunologicznej precyzując molekularny mechanizm jego aktywacji wraz z omówieniem struktury i funkcji inflamasomu NLRP3. W oparciu o trafnie dobrane źródła literaturowe Doktorant wskazuje na istotną rolę nadaktywności inflamasomu w patofizjologii ChAD, ilustrując ten mechanizm za pomocą własnoręcznie zmodyfikowanej ryciny, opracowanej na podstawie pracy Swanson i wsp. (2019), z zachowaniem poszanowania praw autorskich oryginalnego opracowania. Na tle starannie przygotowanego wstępu zwraca jednak uwagę brak omówienia genu Abelson Helper Integration Site 1 (AH/1) – kluczowego dla jednej z publikacji Doktoranta.

Ostatni podrozdział wstępu omawia jony litu jako stabilizator nastroju o potencjale immunomodulującym. Doktorant przedstawia historię terapeutycznego stosowania soli litu i wyjaśnia współczesne rozumienie mechanizmu ich działania, cytując badania sugerujące ich wpływ na funkcje inflamasomu NLRP3. Choć w naukach biologicznych takie uproszczenie jest akceptowalne, warto byłoby doprecyzować, że przedmiotem analizy są jony litu (Li^+), a nie lit w sensie pierwiastka metalicznego, posiadający odmienne właściwości fizykochemiczne – zwłaszcza że w treści pojawia się redakcyjny lapsus w postaci zapisu „ Li^{2+} ”.

Podsumowując, mimo drobnych uchybień redakcyjnych, które nie są powielone w dołączonych publikacjach, wstęp stanowi merytorycznie poprawne i zwięzłe wprowadzenie do tematu. Doktorant trafnie identyfikuje luki w aktualnym stanie wiedzy, wymagające dalszych badań, i konsekwentnie zarysowuje problem badawczy.

3.2. Cel pracy

Cel pracy badawczej został wyrażony w podrozdziale „Założenia rozprawy doktorskiej”. Doktorant prezentuje tam ogólną hipotezę badawczą oraz nieco uszczegółowień. Całość ujęta jest w tekst opisowy, bez wyodrębniania podpunktów definiujących pytania i hipotezy badawcze. Tekst jest w dużej mierze poprawny, jednak przedstawiony miejscami w sposób mglisty, o czym świadczy choćby zwrot: „hipoteza skupia się na zbadaniu”. Hipoteza sformułowana w pierwszym akapicie podrozdziału (i powtórzona w zbliżonej formie w

kolejnym) – zgodnie z którą „węglan litu wpływa na ekspresję markerów związanych ze stanem zapalnym w chorobie afektywnej dwubiegunowej (...) na obwodzie (krew pacjentów z ChAD leczonych węglanem litu)” – mogłaby zostać ujęta precyzyjniej. Zastosowany model badawczy nie pozwala bowiem na jednoznaczną ocenę wpływu, lecz jedynie na identyfikację powiązań. Warto również zwrócić uwagę, że interpretacja różnic między pacjentami ChAD leczonymi litem a grupą kontrolną może odzwierciedlać zarówno efekty leczenia, jak i samą specyfikę schorzenia. Rozdział ten zyskałby na przejrzystości, gdyby zawarte w nim pytania badawcze oraz odpowiadające im hipotezy zostały jasno wypunktowane i precyzyjnie sformułowane w odniesieniu do możliwości weryfikacyjnych zastosowanego modelu badawczego. Warto jednak zaznaczyć, że w publikacji naukowej Doktorant uniknął nieścisłości i sformułował cel badawczy w sposób adekwatny do przyjętej metodologii.

3.3. Materiały i metody, wyniki oraz dyskusja

Oceny tych części pracy Doktoranta dokonałem głównie na podstawie dostępnych publikacji naukowych, które zawierają komplet szczegółów jego dokonań.

3.3.1. Publikacja 1

Pierwszą publikację monotematycznego cyklu stanowi praca przeglądowa pt. „Inflammation-Related Changes in Mood Disorders and the Immunomodulatory Role of Lithium”. Jej Autorami są jedynie Doktorant i Promotor rozprawy doktorskiej, z wiodącą rolą tego pierwszego zwłaszcza w zakresie przygotowania manuskryptu, według danych z podrozdziału *Author Contributions*. Oboje pełnią rolę Autorów korespondencyjnych.

Praca ta w klarowny i wyczerpujący sposób przedstawia obecny stan wiedzy na temat teorii zapalnej choroby afektywnej dwubiegunowej (ChAD), przebiegu procesu aktywacji mikrogleju, mechanizmów przeciwzapalnego działania jonów litu oraz przeciwmaniakalnego i przeciwdepresyjnego działania leków przeciwzapalnych.

Publikacja ta stanowi analizę dostępnej literatury naukowej i podsumowanie stanu wiedzy w przedmiotowym temacie. Była zapewne krokiem wstępnym ku określeniu planu badawczego publikacji 2 i 3 oraz pozwoliła Doktorantowi ukształtować warsztat rozumowania badawczego, analizy piśmiennictwa i umiejętności pisarskie. Mimo to – ze względu na przeglądowy charakter publikacji – nie nosi ona znaczących cech „oryginalnego rozwiązania problemu naukowego” (w myśli pkt. 2 art. 187 Ustawy). Z tego względu publikacja ta nie będzie przedmiotem mojej szczegółowej analizy.

3.3.2. Publikacja 2

Drugą publikację monotematycznego cyklu stanowi praca oryginalna pt. „Abelson Helper Integration Site 1 haplotypes and peripheral blood expression associates with lithium response and immunomodulation in bipolar patients”. Oprócz Doktoranta, który jest pierwszym i korespondencyjnym Autorem, w powstaniu publikacji wzięło udział 13 współautorów, w tym Promotor rozprawy doktorskiej, pracownicy kliniczni z innej jednostki naukowej i pięciu naukowców z zagranicy. Według podrozdziału *Author contribution* wkład Doktoranta polegał na opracowaniu koncepcji badania wraz z Promotorem, współprowadzeniu analizy danych i samodzielnym przygotowaniu tekstu i ilustracji manuskryptu wraz z przeglądem literatury. Doktorant nie brał zatem udziału ani w części klinicznej, ani w pracach laboratoryjnych w zakresie biologii molekularnej. Można rozumieć, że jego rola sprowadziła się do podjęcia zgromadzonych danych i przygotowania na ich podstawie spójnego wyjaśnienia problemu badawczego. Taki zakres obowiązków mógłby tłumaczyć pewną niekonsekwencję planu badawczego, którą komentuję poniżej.

W bieżącej publikacji Autorzy koncertują uwagę na wariantach polimorficznych oraz ekspresji genu Abelson Helper Integration Site 1 (*AHI1*), którego związek z patogenezą zaburzeń neuropsychiatrycznych i immunologicznych w ostatnich badaniach sugerowano. Autorzy dokonali analizy wariantów polimorficznych *AHI1* i jego ekspresji w próbie osób chorych na ChAD leczonych przewlekłe węglanem litu; w badaniu uwzględniono też próbę pacjentów leczonych innymi stabilizatorami nastroju niż lit oraz grupę kontrolną. Analizie poddano dodatkowo ekspresję kilku genów związanych z odpornością nieswoistą.

W zakresie analizy wariantów polimorficznych *AHI1* Autorzy opisują różnice częstości występowania wybranych siedmiu miejsc polimorficznych jednego nukleotydu (SNPs) *AHI1* – ujętych w dwa haplotypy. Analizy dokonano w materiale genetycznym pozyskanym z krwi obwodowej pacjentów ChAD leczonych jonami litu: 48 osób, które odpowiedziały na leczenie litem (wynik w skali Alda ≥ 7) oraz 49 tych, które nie odpowiedziały na leczenie (skala Alda ≤ 3). Wyniki wskazują, że trzy warianty polimorficzne oraz jeden z dwóch zidentyfikowanych bloków haplotypów są istotnie powiązane z odpowiedzią na lit.

W zakresie ekspresji genu *AHI1* w materiale genetycznym krwi obwodowej oraz dziewięciu genów związanych z odpornością nieswoistą (*TLR4*, *CASP4*, *CASP5*, *NLRP3*, *IL-1 α* , *IL-1 β* , *IL-6*, *IL-10* i *IL-18*) Autorzy przeprowadzili badanie w grupie 41 pacjentów ChAD (w tym 21 leczonych węglanem litu, podczas gdy pozostali innymi normotymikami) i 19 osób zdrowych (bez zaburzeń neuropsychiatrycznych i immunologicznych). Wykazano, że jedynie ekspresja *AHI1* jest istotnie powiązana z odpowiedzią terapeutyczną na węglan litu. Tymczasem zarówno ekspresja *AHI1*, jak i wielu genów kodujących białka biorące udział w odporności nieswoistej różnicowała chorych z ChAD od przypadków kontrolnych, ale nie pacjentów ChAD leczonych litem od tych leczonych innymi stabilizatorami nastroju.

Wyniki uzyskane w omawianej pracy są nowatorskie; identyfikują możliwy czynnik odpowiedzi terapeutycznej na jeden z najważniejszych leków stabilizujących nastrój w ChAD. Jednocześnie wskazują na możliwie nieznaczący udział genów związanych z odpornością nieswoistą. Wyniki te mogą pomóc zrozumieć rolę czynników immunologicznych w sposobie działania jonów litu w ChAD. W analizie wyników zabrakło jednak odniesienia do funkcjonalnego znaczenia badanych wariantów genu *AHI1* oraz porównania poziomu jego ekspresji w zależności od obecności określonych wariantów polimorficznych. Rozumiem, że ta ostatnia analiza była niemożliwa do przeprowadzenia ponieważ w jednej próbie pacjentów dokonano genotypowania (97 chorych na ChAD leczonych litem) a na innej (niepokrywającej się) oceny ekspresji genów (21 chorych na ChAD leczonych litem). Taki plan badawczy nosi cechy niekonsekwencji i wymaga wyjaśnienia: dlaczego Autorzy nie zdecydowali się na wykonanie obu analiz u tych samych osób? Potencjalnym wyjaśnieniem takiej decyzji Autorów jest pochodzenie poszczególnych danych z niezależnych badań. Wskazywałyby na to trzy różne opinie komisji bioetycznej na podstawie których przeprowadzono badania do bieżącej publikacji (28/08, 1194/16 i 758/17). Dane, które analizowano na potrzeby bieżącego artykułu mogły zostać wygenerowane dużo wcześniej; być może wspólnie z danymi publikowanymi choćby w artykule Szczepankiewicz A i wsp. „Genes involved in stress response influence lithium efficacy in bipolar patients” *Bipolar Disord* 2018; 20(8): 753-760. Obie prace były finansowane z tego samego źródła (grant Narodowego Centrum Nauki 2016/21/B/NZ5/00148), skład obu zespołów badawczych jest częściowo zbieżny i prace prezentują bardzo podobną metodę rekrutacji i charakterystykę pacjentów. Należy podkreślić, że takie podejście do prowadzenia badań nie jest błędne lub nieetyczne. Trudno doszukiwać się także znamion tzw. *dual publication*, ponieważ hipotezy badawcze obu prac są odmienne. Raczej należałoby nazwać nowszą publikację „analizą wtórną”. Gdyby faktycznie taki stan rzeczy miał miejsce, zasadne byłoby jednoznaczne wskazanie tego faktu w treści publikacji oraz rozprawy w rozdziale o metodach

badawczych i skomentować w dyskusji jako ograniczenie badania, co byłoby najrzetelniejszą możliwą praktyką badawczą.

W analizie danych przedstawionych w bieżącej publikacji Doktoranta – mimo prawidłowo przedstawionych analiz surowych – zabrakło analiz skorygowanych (ang. *adjusted*) o współzmiennne o potencjalnie zakłócającym charakterze (ang. *confounders*), takie jak wiek, płeć, stężenie jonów litu w surowicy, BMI itp. – dane zapewne dostępne dla Badaczy. Takie analizy można by wykonać w podgrupach lub lepiej w ogólnym modelu liniowym (GLM). Przeprowadzenie takich analiz umożliwiłoby ocenę, czy uzyskane wyniki są niezależne od współzmiennnych.

Ubogą w szczegóły częścią publikacji i rozprawy doktorskiej jest ta dotycząca metod badawczych. Nie podano szczegółów metod badania ekspresji genów za pomocą mikromacierzy (czy wyniki walidowano za pomocą ilościowej reakcji łańcuchowej polimerazy qPCR?). Nie oceniono także minimalnej liczebności próby, która powinna być włączona do badania dla uniknięcia błędów II rodzaju, które mogły wystąpić m.in. w przypadku badania współzależności odpowiedzi na lit z ekspresją genów odporności nieswoistej. Ogólne wskazówki, jakie dane raportować w publikacji badania o charakterze obserwacyjnym – w tym w części o metodach badawczych – można znaleźć w kryteriach STROBE (ang. *Strengthening the reporting of observational studies in epidemiology*).

Powyższe wątpliwości wymagają wyjaśnienia, aby móc w pełni ocenić wiarygodność uzyskanych wyników. Mimo tych ograniczeń, konstrukcja omawianej publikacji naukowej jest spójna: wstęp pracy wprowadzający problem badawczy jest zrozumiały, prezentacja wyników w formie tabelarycznej i w postaci rycin z wykresami typu ramka-wąsy dość jasna, dyskusja dojrzała, bogata i wieloaspektowa. W tej ostatniej zabrakło jedynie rozwinięcia potencjalnego mechanizmu w jakim *AH1* i jego produkt może uczestniczyć w odpowiedzi terapeutycznej na jony litu (jakkolwiek spekulatywny miałoby to charakter). Ponieważ za te rzetelnie opracowane fragmenty publikacji w większości odpowiadał Doktorant, jego wkład w powstanie pracy oceniam jako zdecydowanie pozytywny. Wynik jego aktywności świadczy o umiejętności formułowania problemu badawczego, jego analizy i wyciągania w dużej mierze poprawnych wniosków. Oceniam też indywidualny wkład Doktoranta w powstanie dzieła jako znaczący, uzasadniający jego czołową rolę w wykazie wszystkich Autorów.

3.3.3. Publikacja 3

Trzecią publikację monotematycznego cyklu stanowi praca oryginalna pt. „Immunomodulatory effect of lithium treatment on in vitro model of neuroinflammation”. Jej pierwszym i korespondencyjnym Autorem – podobnie jak dwu poprzednich – jest Doktorant. Poza nim publikacja powstała przy udziale pięciu współautorów – wszyscy z jego jednostki badawczej – w tym Promotor rozprawy doktorskiej. Według podrozdziału *CRedit authorship contribution statement* Doktorant wraz z Promotorem opracowali koncepcję badania; Doktorant pozyskał fundusze na przedmiotowe badanie, pełnił jednoosobową rolę administratora projektu, a ponadto we współpracy z innymi dobierał metody badawcze oraz wykonywał prace laboratoryjne i analizy. Był także twórcą manuskryptu (oprócz ilustracji). Należy wnioskować, że w przeciwieństwie do poprzedniej publikacji, Doktorant był głównym twórcą omawianego dzieła od samego jego początku aż do końca, wliczając praktycznie każdy aspekt prac badawczych, w tym mając szansę wykazać się w roli koordynatora zespołu naukowego.

Niniejsza publikacja raportuje wyniki badań w modelu hodowli komórkowej nieśmiertelnionego ludzkiego mikrogleju HMC3. Model zapalenia był wywoływany mieszaną cytokin dodawanych do hodowli. Komórki w standardowej pożywce

doświadczalnej i w modelu zapalnym były traktowane jonami litu w jednym stężeniu mającym odzwierciedlać stężenie mózgowe litu podczas farmakoterapii, aby zweryfikować hipotezę o wpływie leku na ekspresję genów związanych z aktywacją inflamasomu NLRP3. Analizy prowadzono w komórkach inkubowanych z jonami litu przez 1 i 5 dni oraz z różnych sekwencją dodawania litu i stymulowania zapalenia.

Analizie poddano ekspresję mRNA ośmiu genów związanych z inflamasomem NLRP3 (*TSPO*, *TLR4*, *NFKB1*, *NLRP3*, *CASP1*, *CASP4*, *IL-1 β* i *IL-6*), częściowo pokrywających się z listą genów badanych w poprzedniej pracy w modelu klinicznym. W tym przypadku zastosowano metodę qPCR, poprzedzoną izolacją całkowitego RNA i przeprowadzeniem odwrotnej transkrypcji, z użyciem specyficznych, autorsko zaprojektowanych starterów. W celach kontrolnych oceniano ekspresję genu referencyjnego *GAPDH*. Ponadto z nadsącach pochodowlanych oceniono aktywność kaspazy 1 i stężenie mleczanu metodą luminescencyjną oraz stężenie *IL-1 β* metodą immunoenzymatyczną (ELISA). Dodatkowo izolowano białko z lizatów komórkowych, aby ocenić metodą Western Blot zawartość całkowitego i Ser9-fosforylowanego GSK-3 β ; porównując ich poziomy Autorzy ocenili aktywność tego ważnego białka pośredniczącego w mechanizmie działania litu.

Biorąc pod uwagę przemyślany plan badawczy i dokładność opisów procedur, można wnioskować o wiarygodności uzyskanych wyników. Te wskazują, że krótkotrwałe i długotrwałe traktowanie jonami litu komórek stymulowanych koktajlem cytokin obniża ekspresję mRNA niektórych genów związanych z inflamasomem NLRP3 oraz zmniejsza wydzielanie *IL-1 β* . Co ciekawe jony litu podane przed stymulacją zapalną, zwiększały ekspresję genów inflamasomu i wydzielanie *IL-1 β* . Oznacza to, że nie potwierdzono postulowanego w literaturze działania protekcyjnego litu na aktywację zapalną mikrogleju. Analiza aktywności kaspaz wykazała, że krótkotrwałe traktowanie litem powodowało istotne podwyższenie ich aktywności. Zauważono, że charakterystyczne dla mechanizmu działania litu hamowanie aktywności GSK-3 β poprzez fosforylację białka miało miejsce tylko przy długotrwałej inkubacji komórek z litem.

W podsumowaniu omawiania publikacji 3 oraz we wniosku 3 w rozprawie doktorskiej Doktorant wskazuje, że długotrwałe traktowanie litem stymulowanych zapalnie komórek mikrogleju powoduje zmniejszenie aktywacji inflamasomu i sekrecji *IL-1 β* , co zachodzi poprzez inhibicję GSK-3 β . Choć należy wnioskować o powiązaniu tych dwóch zjawisk (zmniejszenie aktywacji inflamasomu oraz inhibicja GSK-3 β), plan badawczy nie pozwala na ocenę mediacyjnego charakteru inhibicji GSK-3 β w działaniu przeciwzapalnym litu. Aby zweryfikować taką hipotezę, należałoby zastosować dodatkowo selektywny inhibitor lub wyciszenie GSK-3 β . Wiadomo bowiem, że GSK-3 β nie jest jedynym punktem uchwytu dla jonów litu i mechanizm może prowadzić także przez inne szlaki.

Pomimo ogromnej wartości pracy, w obowiązku recenzenta leży wskazanie nie poddanych dyskusji ograniczeń i słabości pracy, a także proponowanych dalszych dróg badania przedmiotowego tematu. Dlatego potrzeba postawić następujące pytania i komentarze.

Dlaczego po wykonaniu danego wariantu eksperymentu i wymyciu pożywki z badanymi czynnikami (cytokiny lub jony litu), komórki pozostawiano na dodatkowe 24 godziny w pożywce bez dodatków czynników eksperymentalnych (pozyskanie pożywki kondycjonowanej)? Czy ten dodatkowy czas bez oddziaływania czynnika eksperymentalnego mógł niwelować lub maskować wywołany wcześniej efekt?

Dlaczego nie przedstawiono wyników ekspresji genów *TSPO* i *TLR4* po krótkotrwałej stymulacji komórek cytokinami (rycina 2 publikacji)? Czy wynik ekspresji był nieistotny statystycznie? Każdy wynik wymaga przedstawienia niezależnie od jego „istotności”, w

przeciwnym razie odnosi się wrażenie jakby stymulacja cytokinami zwiększała ekspresję wszystkich badanych genów.

Moje doświadczenie z zestawem do oznaczania cytokin *DuoSet ELISA assay Biotechne* wskazuje na możliwe duże współczynniki zmienności między replikatami technicznymi (*intra-assay CV*) oraz między wzorcami zewnętrznymi a wartościami oznaczonymi (*inter-assay CV*). Jaką liczbę replikatów technicznych wykonano i jakie były współczynniki zmienności?

Godna pochwały jest niewielka względna zmienność wyników w obrębie tych samych warunków eksperymentalnych, mogąca świadczyć o umiejętnościach laboratoryjnych zespołu badawczego. Pozwoliło to na wykonanie jedynie trzech powtórzeń biologicznych. Czy jednak te replikaty biologiczne pochodzą z trzech niezależnych eksperymentów? Czy też odzwierciedlają materiał zebrany z trzech dołków zastosowanej w jednym eksperymencie płytki 12-dołkowej? Czy analizy Western blot wykonywano także w tryplikatach? Rycina 7 nie pokazuje słupków błędów, punktów odzwierciedlających dane indywidualne ani testów statystycznych, co sugeruje pojedynczy eksperyment.

Dodatkowym walorem pracy byłoby zapewne wykazanie zależności dawka-efekt, co mogłoby być możliwe przy zastosowaniu co najmniej dwóch stężeń litu. To niższe mogłoby odzwierciedlać stężenie uzyskiwane w profilaktyce przeciwmaniakalnej (0,5-0,8 mmol/l w surowicy) w przeciwieństwie do leczenia ostrego epizodu maniakalnego (do 1,2 mmol/l w surowicy), czy do stężeń toksycznych (powyżej 1,2 mmol/l w surowicy).

Dlaczego aktywność kaspazy 1 oceniano w nadsączach pochodowlanych, a nie w lizatach komórkowych, skoro rola enzymu w inflammasomie sprowadza się do wewnątrzkomórkowego dojrzewania cytokin? Czy zmiany aktywności enzymu w nadsączach obrazują podwyższenie aktywności inflammasomu, czy raczej uszkodzenie błony komórkowej lub pyroptozę?

Dlaczego w niniejszej pracy nie badano ekspresji *AHI1*? Mogłoby to stanowić próbę walidacji uzyskanych wcześniej ciekawych wyników w modelu klinicznym.

W analizie statystycznej Doktorant mógłby pokusić się o wykonanie wieloczynnikowej analizy wariancji z analizą interakcji (zapalenie, lit, czas), która pozwoliłaby szerzej zweryfikować wpływ poszczególnych czynników na badane efekty.

Powyższa lista pytań nie przekreśla rozlicznych zalet pracy Doktoranta, ponieważ nie wypunktowuje obiektywnych błędów, a raczej wskazuje drobne wątpliwości i propozycje dalszego rozwoju tematu. Dlatego z mocą podkreślam, że przedstawiona mojej ocenie praca charakteryzuje się bogactwem metodologicznym, prawidłowym przedstawieniem wyników i w znacznej większości wniosków. Stanowi niewątpliwie krok milowy w rozumieniu mechanizmów i efektów działania jonów litu w odniesieniu do zapalnej teorii ChAD. Co ważne, dowodzi przede wszystkim dojrzałości naukowej Doktoranta. Prognozuję, że publikacja ta stanie się inspiracją dla innych zespołów naukowych w projektowaniu badań w modelu komórkowym, a nawet dla badaczy przedklinicznych i samych klinicystów w celu lepszego zrozumienia działania litu.

3.3.4. Ocena oryginalności pracy, praktycznego zastosowania jej wyników i indywidualnego wkładu Doktoranta

Prace stanowią niewątpliwie oryginalne rozwiązanie problemu naukowego. Doktorant postawił pytania badawcze, wykorzystał uznane metody biochemiczne i biologii molekularnej (m.in. ocena genotypu, ocena ekspresji genów za pomocą mikromacierzy i qPCR, ocena ekspresji białek metodą ELISA i Western blot), aby po raz pierwszy wykazać, że genotyp i ekspresja *AHI1* ma związek z odpowiedzią kliniczną na lit, a ekspresja genów nieswoistej odpowiedzi immunologicznej zmienia się pod wpływem litu *in vitro*. Wyniki mają duże

znaczenie poznawcze w celu lepszego zrozumienia mechanizmu działania litu i patogenezы ChAD, mogą napędzać poszukiwania nowych leków wykazujących podobny mechanizm. Również indywidualny wkład Doktoranta w powstanie publikacji był znaczący, aby stanowić o jego wiodącym zaangażowaniu z projekt.

3.4. Wnioski

Wnioski płynące z badań Doktoranta zostały ujęte w cztery punkty, z których trzy dotyczą prac oryginalnych. Każdy z nich jest sformułowany w sposób opisowy w kilku zdaniach. Niektóre wnioski są nazbyt śmiałe i nie w pełni uzasadnione wynikami badań. W drugiej części wniosku nr 2 Doktorant twierdzi, że „analiza ekspresji genów związanych z nieswoistą odpowiedzią immunologiczną sugeruje immunomodulacyjny wpływ leczenia litem na ekspresję genów związanych z funkcjonowaniem inflamasomu NLRP3”. Tymczasem, ekspresja żadnego z badanych genów nieswoistej odpowiedzi immunologicznej nie jest zmieniona w grupie ChAD leczonych litem w stosunku do innego leku stabilizującego nastrój, a jedynie wobec grupy kontrolnej. Nie musi to odzwierciedlać metody leczenia, a być może przebieg samego procesu chorobowego, tak jak wskazywałem to w ocenie celu pracy. Ponadto sugerowanie mediacyjnego charakteru GSK-3 β w działaniu immunomodulującym litu (wniosek nr 3) jest spekulatywne – plan badawczy nie pozwalał na weryfikację takiej hipotezy. Poza tym wnioski są sformułowane poprawnie.

3.5. Piśmiennictwo i streszczenia

Piśmiennictwo zostało dobrane prawidłowo. Około połowa z cytowanych prac pochodzi z ostatniego dziesięciolecia; Doktorant nie stroni też od kilku dużo starszych źródeł, nawet z XIX w., właściwie wyselekcjonowanych w celu przedstawienia rysu historycznego tematu. Streszczenia badań zarówno w języku polski i angielskim są poprawne, treściowo spójne, choć powielają niedociągnięcia przedstawione przeze mnie powyżej.

3.6. Orzeczenie komisji bioetycznej

Przedstawiono orzeczenie komisji bioetycznej zatwierdzające zmianę tytułu przedmiotowej pracy doktorskiej. Pierwotnie miały to być mniej ściśle zdefiniowane mechanizmy działania litu, badane także w modelu zwierzęcym. Zabrakło przedstawienia orzeczenia komisji bioetycznej dotyczącej badania na ludziach, które stanowi publikację 2 Doktoranta – co jednak nie jest formalnie wymagane. Jak wcześniej wspomniałem badanie to zostało przeprowadzone w oparciu o trzy zgody komisji bioetycznej, co może wyjaśniać ograniczenia metodologiczne dyskutowane przeze mnie wcześniej.

4. Aktywność i dorobek naukowy Doktoranta

Prace wliczane do cyklu doktorskiego zostały opublikowane w renomowanych, wysokowpływowym czasopismach o ponadprzeciętnym jak na ten etap kariery naukowej sumarycznym współczynniku wpływu IF = 14,3; każda praca punktowana po 140 pkt. wg MNiSW. Zostały opublikowane przez różne domy wydawnicze (MDPI, Springer i Elsevier).

Według analizy bazy danych Web of Science Core Collection (na dzień 06 maja 2025 r.) Doktorant jest autorem i współautorem w sumie 10 prac naukowych, w tym dwóch streszczeń zjazdowych i siedmiu artykułów oryginalnych, będąc pierwszym autorem sześciu z tych prac. Są to w większości prace w tematach bliskich neuropsychofarmakologii. Świadczy to o szerokiej aktywności naukowej Doktoranta, nie ograniczonej jedynie do przedmiotowej rozprawy. Jego publikacje były cytowane 60 razy (a to należy uznać dopiero za początek, biorąc pod uwagę niedawny czas publikacji prac – pierwsze prace publikowane

w 2020 r.), wskaźnik Hirscha = 3. Doktorant był też recenzentem pięciu manuskryptów prac naukowych w prestiżowych periodykach.

Doktorant brał udział w trzech projektach, w tych dwóch finansowanych ze źródeł zewnętrznych – Narodowe Centrum Nauki. Był kierownikiem projektu wewnętrznego – Dużego Grantu Badawczego z dotacji statutowej dla doktorantów Szkoły Doktorskiej Uniwersytetu Medycznego im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu. Jest aktywnym działaczem międzynarodowego towarzystwa *European College of Neuropsychopharmacology* (ECNP) i brał udział w prestiżowym szkoleniu organizowanym przez to towarzystwo. Trzykrotnie otrzymywał również nagrody za prezentacje doniesień zjazdowych na dorocznych konferencjach ECNP.

Przedstawiona powyżej aktywność świadczy o imponującym zaangażowaniu na rzecz nauki oraz o dobrze przemyślanej, konsekwentnie realizowanej ścieżce badawczej, prowadzonej z dużym rozmachem – co w pełni uzasadnia moją najwyższą ocenę.

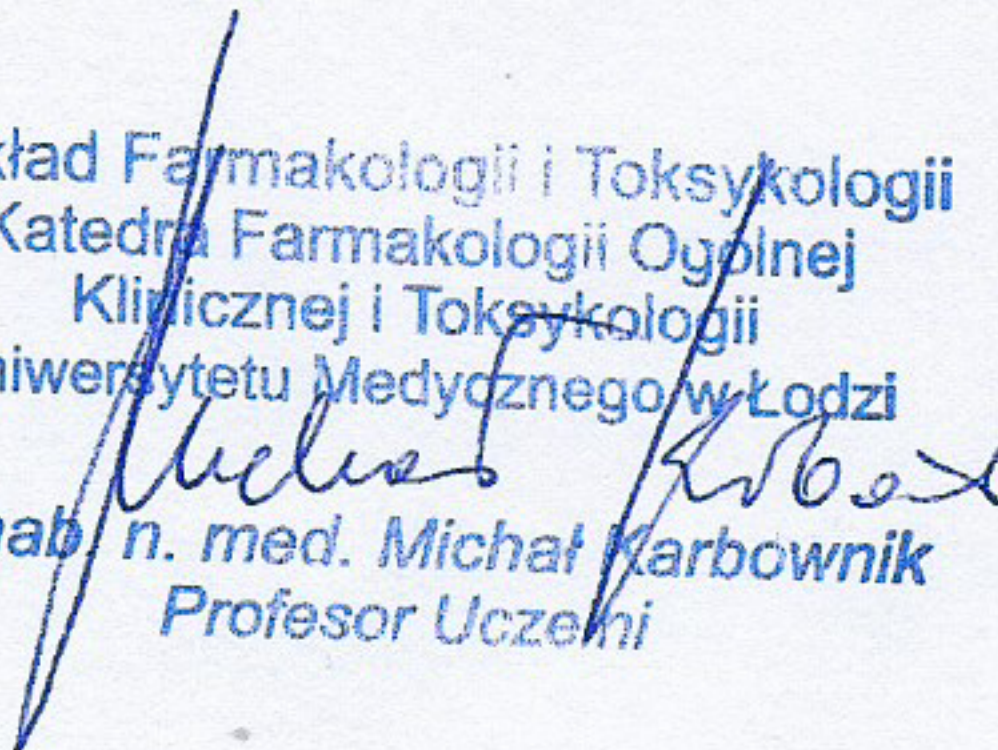
5. Podsumowanie

Przedłożona rozprawa doktorska mgr. Kosmy Sakrajdy stanowi wartościowy i oryginalny wkład w badania nad mechanizmami immunologicznymi w chorobie afektywnej dwubiegunowej, ze szczególnym uwzględnieniem leczenia solami litu. Rozprawa została przygotowana zgodnie z obowiązującymi wymogami, opiera się na solidnych podstawach metodologicznych i zawiera nowatorskie ujęcie problematyki. Autor wykazuje się dojrzałością naukową, umiejętnością krytycznej analizy literatury, redagowania tekstów naukowych, trafnego doboru metod badawczych oraz samodzielnego prowadzenia doświadczeń, a także analizy i interpretacji wyników.

Mimo drobnych uchybień formalnych i nieścisłości w zakresie wyrażenia hipotez oraz szczegółów metodologicznych, całość pracy cechuje się wysokim poziomem merytorycznym i dużą wartością poznawczą. Wkład Doktoranta w realizację poszczególnych etapów badań jest znaczący i należycie udokumentowany. Na szczególne uznanie zasługuje również jego szeroka aktywność naukowa oraz publikacyjna, wykraczająca poza wymagania stawiane doktorantom.

Stwierdzam, że przedstawiona rozprawa spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. 2018 poz. 1668), w związku z czym wnioskuję o dopuszczenie Doktoranta do dalszych etapów przewodu.

Biorąc pod uwagę nowatorskie ujęcie problematyki, zaawansowany warsztat metodyczny i wartość uzyskanych wyników, a także imponujący dorobek i zaangażowanie naukowe, w tym ponad miarę spełnione formalne kryteria naukometryczne, wnioskuję o wyróżnienie przedmiotowej rozprawy doktorskiej.

Zakład Farmakologii i Toksykologii
Katedra Farmakologii Ogólnej
Klinicznej i Toksykologii
Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

dr hab. n. med. Michał Karbownik
Profesor Uczelni

dr hab. n. med. Michał Karbownik, prof. UM