WARSZAWSKI
UNIWERSYTET
MEDYCZNY

KATEDRA I ZAKŁAD FARMAKOLOGII DOŚWIADCZALNEJ I KLINICZNEJ

Dr hab. n. med. Justyna Pyrzanowska

Adiunkt

Katedra i Zakład Farmakologii
Doświadczalnej i Klinicznej

Warszawski Uniwersytet Medyczny

Warszawa, 6 czerwca 2022 r.

Ocena rozprawy mgr Michała Rychlika

p.t. „The role of mouse zinc-sensing GPR39 receptor in memory functions associated with Alzheimer's disease"

na stopień doktora w dyscyplinie nauk farmaceutycznych

wykonanej pod kierunkiem Prof. dr hab. Katarzyny Młyniec w Katedrze Farmakobiologii Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Jagiellońskiego.

Przedstawiona do recenzji praca doktorska zawiera wyniki badań nad rolą receptora cynkowego GPR39 w procesach pamięciowych związanych z chorobą Alzheimera. Oceniana dysertacja jest zwartą monografią przedstawioną w języku angielskim. Ma typowy układ i jest podzielona na część teoretyczną obejmującą listę skrótów, streszczenie, wstęp i cele pracy, a także na część praktyczną zawierającą materiały i metodykę badań, wyniki, dyskusję zakończoną wnioskami i podsumowaniem oraz spis

ul. Banacha 1B
02-097 Warszawa
www.farmakologia.wum.edu.pl

tel.: +48 22 11 66 160
farmakologia@wum.edu.pl

piśmiennictwa. Całość liczy 81 stron, obejmuje 2 tabele, 26 rycin oraz 163 pozycje piśmiennictwa z lat 1978 - 2021.

Problem badawczy

W rozprawie podjęto istotny temat poszukiwania mechanizmów zaburzeń poznawczych, które są typowo spotykane w przebiegu choroby Alzheimera. Badania opisane w pracy dotyczą roli metabotropowego receptora cynkowego GPR39 i jego oddziaływania na pamięć epizodyczną i proceduralną myszy. Oceniano efekty behawioralne i neurochemiczne podawania: TC-G 1008 (agonisty receptora GPR3), memantyny (antagonisty receptora NMDA) u zwierząt z wyłączonym genem GPR3 oraz oddziaływanie obu związków w modelu neurodegeneracji spowodowanej deficytem neurotroficznego czynnika pochodzenia mózgowego BDNF.

Wstęp liczy 18 stron i jest opracowany w przystępny sposób z wykorzystaniem aktualnego piśmiennictwa. Doktorant omawia w nim epidemiologię choroby Alzheimera, a następnie szczegółowo opisuje rozwój wiedzy dotyczący patologii choroby i jej współczesnej definicji. W obszernym akapicie Autor zwraca uwagę na zaburzenia kognitywne występujące w przebiegu choroby i wyczerpująco opisuje neuroanatomię pamięci epizodycznej oraz rolę cynku w procesach neurotransmisji i neuromodulacji wskazując na wiodącą rolę hipokampa. Opierając się na aktualnej wiedzy Doktorant uzasadnia szczegółowo wybór tematu badawczego. Wskazuje na możliwość badania ekwiwalentu pamięci epizodycznej u zwierząt doświadczalnych. Tłumaczy dokładnie rolę cynku w patogenezie choroby Alzheimera, podkreślając jego interakcję z cząsteczkami beta-amyloidu i białka Tau oraz udział w neuromodulacji receptorów glutamatergicznych, GABA i glicynowych, a także neurotransmisji poprzez receptor GPR39. Beta-amyloid wiążąc jony Zn^{2+} zaburza sygnalizację zależną od cynku oraz wpływa na receptor GPR39 i jego wewnątrzkomórkowe cele. Warto zwrócić uwagę, że Doktorant jest współautorem pracy przeglądowej szczegółowo przedstawiającej funkcje receptora cynkowego oraz jego udział w rozwoju demencji (Curr Neuropharmacol 2020, IF = 7.36). Brak w dostępnym piśmiennictwie przedklinicznych prac eksperymentalnych przedstawiających wpływ receptora cynkowego GPR39 na

ul. Banacha 1B
02-097 Warszawa
www.farmakologia.wum.edu.pl
tel.: +48 22 11 66 160
farmakologia@wum.edu.pl

procesy pamięciowe w pełni uzasadnia celowość projektu jako tematu pracy doktorskiej. Pewien niedosyt pozostawia fakt, że nie ma w rozprawie osobnego akapitu, w którym podsumowane zostałyby założenia pracy i hipoteza badawcza oraz deklaracja rozwiązania nowego problemu badawczego.

Cele pracy są sformułowane poprawnie. Doktorant zaplanował ocenę roli receptora GPR39 w procesach pamięciowych zależnych od hipokampa. Przedstawione cele badawcze obejmują: 1. ustalenie czy receptor GPR39 moduluje ekwiwalent pamięci epizodycznej u gryzoni i czy jego działanie jest specyficzne dla tego typu pamięci deklaratywnej; 2. ocenę możliwości farmakologicznej modulacji pamięci zależnej od GPR39 oraz ustalenie czy receptor jest niezbędny do prokognitywnego działania leku stosowanego w farmakoterapii choroby Alzheimera - memantyny; 3. zbadanie wpływu farmakologicznych manipulacji receptora GPR39 na zdolności poznawcze powiązane ze zmianami neuropatologicznymi (deficyt BDNF); 4. ocenę ekspresji mRNA i poziomów wybranych białek w hipokampie, związanych z neurotransmisją pobudzającą/ glutaminergiczną lub hamującą/GABA-ergiczną, szlakami sygnałowymi, stresem oksydacyjnym i neuroprotekcją.

Część doświadczalna

Materiał i metody użyte w pracy są wybrane prawidłowo, ale opisane w sposób zwięzły i skrótowy, co zmniejsza klarowność tekstu. Wszystkie procedury eksperymentalne wykonane na zwierzętach w tej pracy uzyskały pozytywną opinię I Lokalnej Komisji Do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach w Krakowie, jednak nie podano numeru uchwały. Plan doświadczeń i dobrane metody behawioralne nie budzą zastrzeżeń. Zaplanowane cele Doktorant realizował oceniając zachowanie szczepów myszy z nokautem GPR39 i kontrolnych w testach labiryntu wodnego, nowości i bieżni obrotowej. Badał ponadto efekty doraźnego podania specyficznego agonisty receptora GPR39 - związku TC-G 1008 i memantyny (niekompetytywnego antagonisty receptora NMDA) na substytut pamięci epizodycznej i jego konsolidację oraz efekty przedłużonego podawania tych związków na substytut pamięci epizodycznej i pamięć przestrzenną szczepów myszy nokautów GPR39, heterozygot BDNF i kontrolnych. Do badań ekspresji

ul. Banacha 1B
02-097 Warszawa
www.farmakologia.wum.edu.pl
tel.: +48 22 11 66 160
farmakologia@wum.edu.pl

genów metodą reakcji łańcuchowej polimerazy PCR i białek metodą Western Blot, związanych z neuroprzekaźnictwem, przeżywalnością i plastycznością neuronalną, Doktorant pobrał hipokampy od zwierząt kontrolnych i z wyłączonym GPR39. Struktury te ocenił również po doraźnym podaniu agonisty receptora GPR39 oraz po długotrwałym stosowaniu związku TC-G 1008 i memantyny u myszy kontrolnych, z nokautem GPR39 i heterozygot BDNF.

Do tej części pracy nasuwa się kilka uwag. W opisie badań behawioralnych warto byłoby uwzględnić interpretację parametrów, które Doktorant decyduje się oceniać i opisać dokładnie cel przeprowadzenia poszczególnych procedur, jak również uzasadnić wybór zwierząt do planowanych eksperymentów. Z uwagi na złożony projekt eksperymentalny obejmujący dziewięć doświadczeń, dużym ułatwieniem dla Czytelnika byłaby tabela, w której umieszczone zostałyby informacje o użytych w kolejnych etapach prac zwierzętach, ich rodzaju, wieku, płci, grupach eksperymentalnych i liczbie n w konkretnej grupie, a także podanych lekach, wykonanych testach i pobranym materiale. Uwzględnione one zostały w rozprawie w wielu różnych akapitach i zmuszają do ich ciągłego wyszukiwania. Zamieszczony schemat eksperymentu (ryc. 5) prezentuje tylko część informacji dotyczącej metodyki badań. W doświadczeniach 3-7 nie zostały dokładnie opisane liczebności grup użytych myszy, a zwłaszcza nie wiadomo ilu zwierzętom podano lek. Ponadto brakuje wyjaśnienia dla wyboru memantyny do planowanych doświadczeń oraz drogi jaką podano lek.

Wyniki opisane w pracy doktorskiej zajmują 22 strony i są przedstawione w sposób zwięzły. Metody statystyczne są dobrane i opisane prawidłowo, ale obliczenia są przedstawione selektywnie. Mankamentem przedstawionej pracy jest, w mojej ocenie, brak zamieszczonych wyników statystyki podstawowej z obserwacji behawioralnych w postaci średnich i odchyleń standardowych deklarowanych parametrów i ujęcie ich choćby w tabelach. Wartości te są uwzględnione jedynie w postaci graficznej na rycinach, które jednakże są małe i słabo czytelne. Na rycinach pojawiają się oznaczenia, które nie są opisane (gwiazdki na ryc.21) lub inne wartości niż w tekście (wartość p na

ul. Banacha 1B
02-097 Warszawa
www.farmakologia.wum.edu.pl
tel.: +48 22 11 66 160
farmakologia@wum.edu.pl

ryc. 8). Ryc. 13 w eksperymencie 2 jest mylnie zacytowana jako 10. Ponadto wyniki analizy wariancji są zamieszczone wybiórczo, np. nie ma ich dla testu ELM w eksperymencie 8; to samo odnosi się do analizy post-hoc, np. brak jej w teście pamięci labiryntu wodnego w eksperymencie 8. Ograniczanie publikowania wyników i obliczeń statystycznych, niewątpliwie wbrew intencjom, utrudnia czytanie pracy.
W cyklu swoich doświadczeń Doktorant wykazał, że wyłączenie genu GPR39 zmienia zachowanie myszy w teście nowości i labiryntu wodnego. Agonista receptora GPR39 (TC-G 1008) podany doraźnie miał wpływ na niektóre aspekty pamięci podobnej do epizodycznej u samców myszy WT, natomiast antagonista receptora NMDA (memantyna) podany doraźnie nie oddziaływał na ten rodzaj pamięci u myszy kontrolnych WT i transgenicznych KO GPR39. Przedłużone podawanie TC-G 1008 nie miało wpływu na pamięć deklaratywną u myszy kontrolnych, z nokautem GPR39 oraz z deficytem BDNF, podczas gdy podawanie memantyny oddziaływało na parametr przestrzenny testu nowości u myszy WT i KO GPR39. W ocenie biochemicznej Autor opisał zmiany w ekspresji mRNA oraz stężenia białek w hipokampie u myszy nokautów GPR39, zarówno bez interwencji farmakologicznej, jak i po podaniu agonisty receptora GPR39 , a także u heterozygot BDNF otrzymujących memantynę i związek TC-G 1008.

Dyskusja zajmuje 9 stron i jest podzielona na podrozdziały. Doktorant sprawnie i przejrzyście zestawia wyniki swoich badań z dostępnym, aktualnym piśmiennictwem.

Wnioski końcowe w liczbie 6 są przedstawione jako „highlights" i sformułowane zostały bardzo ogólnie. Jednakże są logiczne i pozostają w zgodzie z przeprowadzonymi eksperymentami.

Podsumowując, rozprawę doktorską magistra Michała Rychlika, pomimo zgłoszonych zastrzeżeń, oceniam pozytywnie. Temat pracy jest interesujący i aktualny. Część teoretyczna i praktyczna została przemyślana i zaprojektowana prawidłowo. Wyniki przedstawione zostały w sposób skrótowy, a następnie szerzej omówione w dyskusji. Opisane badania dostarczają nowych danych w zakresie farmakologii doświadczalnej.

ul. Banacha 1B
02-097 Warszawa
www.farmakologia.wum.edu.pl
tel.: +48 22 11 66 160
farmakologia@wum.edu.pl

Konkluzja recenzji

Stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr Michała Rychlika zatytułowana „The role of mouse zinc-sensing GPR39 receptor in memory functions associated with Alzheimer's disease", stanowiąca dorobek naukowy Doktoranta, spełnia warunki określone w art. 187 ustawy z dn. 20 lipca 2018 r. „Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. 2018 poz. 1668 z późn. zm.)".

W związku z powyższym zwracam się do Rady Dyscypliny Nauki Farmaceutyczne Uniwersytetu Jagiellońskiego – Collegium Medicum z wnioskiem o dopuszczenie mgr Michała Rychlika do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Dr hab. n. med. Justyna Pyrzanowska

ul. Banacha 1B
02-097 Warszawa
www.farmakologia.wum.edu.pl

tel.: +48 22 11 66 160
farmakologia@wum.edu.pl