

Dr hab. Joanna Jakubowicz-Gil

Lublin, 31.08.2018

Zakład Anatomii Porównawczej i Antropologii
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie
ul. Akademicka 19
20-033 Lublin

Recenzja

rozprawy doktorskiej Pana lek. wet. Karola Rycerza pt.: „Wpływ doustnego podawania rebaudiozydu A na immunoreaktywność acetylocholinesterazy i receptorów muskarynowych M1 w neuronach hipokampa i prążkowie”.

Pan lek. wet. Karol Rycerz wykonał pracę doktorską w Zakładzie Histologii i Embriologii Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie pod kierunkiem Pani prof. dr hab. Jadwigi Jaworskiej-Adamu.

Ocena merytoryczna pracy

Przedstawiona mi do recenzji praca doktorska obejmuje dobrze zaplanowane i wykonane badania laboratoryjne, w których Autor analizował wpływ rebaudiozydu A, glikozydu stewiolowego, na morfologię neuronów hipokampa i prążkowie szczurów, czyli struktur ośrodkowego układu nerwowego odpowiedzialnych za pamięć i uczenie się. Analizy przeprowadzono pod kątem immunodetekcji acetylocholinesterazy (AChE) oraz postsynaptycznego receptora muskarynowego M1 (mAChRs-M1), odpowiedzialnych za zwiększanie plastyczności komórkowych mechanizmów pamięci i uczenia się. Rebaudiozyd A jest substancją izolowaną z liści rośliny *Stevia rebaudiana Bertoni*, gdzie stanowi 2-4% substancji słodzących. Jego walory smakowe (200-300 razy słodszy od sacharozy oraz charakterystyczna goryczka) są chętnie wykorzystywane w przemyśle spożywczym do produkcji naturalnych słodzików. Został uznany przez światowe organizacje zdrowia, jako nietoksyczny, a nawet wykazano jego właściwości terapeutyczne. Stosowanie rebaudiozydu A obniżało bowiem ciśnienie krwi, pobudzało układ immunologiczny, działało przeciwzapalnie i przeciwnowotworowo. Związek ten zwiększał wydzielanie insuliny oraz był dobrze tolerowany

przez osoby chore na cukrzycę. Duże nadzieje wiąże się z wykorzystaniem glikozydu stewiolowego w leczeniu lub łagodzeniu objawów chorób neurologicznych, takich jak choroba Alzheimera, Parkinsona, Huntingtona, zespół Tourett'a, epilepsja czy autyzm. Jednak jak większość związków pochodzenia naturalnego, dopuszczonych do powszechnej konsumpcji, rebaudiozyd A wzbudza pewne kontrowersje ze względu na pojawiające się w literaturze naukowej doniesienia o negatywnym wpływie na organizm człowieka. Dlatego też kontynuację badań nad bezpieczeństwem stosowania rebaudiozydu A uważam za celowe i bardzo uzasadnione.

Doktorant w swojej pracy potwierdził brak negatywnego wpływu rebaudiozydu A na komórki ośrodkowego układu nerwowego. Nie wykazał istotnego wpływu glikozydu stewiolowego na przyrost masy ciała i mózgu badanych szczurów jak również morfologię neuronów hipokampa i prążkowie. Co ciekawe, zaobserwował wzrost liczby i gęstości neuronów, co może mieć wpływ na poprawę procesów pamięci i uczenia się. Jednak badania bezpośrednio potwierdzające zależność pomiędzy spożyciem RebA a zapamiętywaniem nie zostały wykonane. Jak czytamy w Dyskusji, zwierzęta nie były poddawane testom na pamięć i uczenie się ze względu na eliminowanie czynnika stresogennego. W mojej opinii, stosowne badania (np. wspomniany w Dyskusji labirynt Morris'a) mogłyby jednoznacznie potwierdzić słuszność postawionych wniosków i wzbogacić pracę o nowe, cenne doniesienia. Jeszcze jedna uwaga dotyczy nadinterpretacji wyników, dotyczących immunoreaktywności acetylocholinesterazy. Doktorant w oparciu o technikę immunohistochemii obserwował wzrost gęstości neuronów AChE-pozytywnych, co odczytał jako wzrost ekspresji (a nawet aktywności) enzymu. Jednak towarzyszący temu spadek intensywności reakcji immunohistochemicznej w poszczególnych komórkach uniemożliwia wyciągnięcie takiego wniosku. Aby potwierdzić tę tezę, należałoby wykonać dodatkowe testy na poziomie molekularnym, precyzyjnie określające wpływ Reb A na poziom ekspresji i aktywność AChE. Należy mieć nadzieję, że Doktorant podejmie próbę wyjaśnienia powyższych problemów badawczych w swojej dalszej pracy naukowej.

Ocena struktury pracy

Rozprawa doktorska lek. wet. Karola Rycerza liczy 132 strony maszynopisu napisanego w języku polskim. Układ pracy jest typowy dla rozpraw doktorskich.

Pracę rozpoczyna czytelny Spis treści. We Wstępie, liczącym 18 stron, Doktorant scharakteryzował model badawczy oraz podsumował dotychczasową wiedzę, dotyczącą pochodzenia oraz działania rebaudiozydu A. W przystępny sposób przedstawił budowę hipokampa i prążkowiec oraz scharakteryzował strukturę i funkcje układu cholinergicznego, co zilustrował przejrzystymi fotografiami i rycinami. Przedstawione po Wstępie cele zostały jasno sformułowane.

W Materiałach i Metodach, Doktorant opisał model oraz procedurę badawczą, jak również techniki wykorzystane do badań. Metodyka została trafnie dobrana do postawionych celów. Brakuje jednak informacji skąd pochodził rebaudiozyd A – czy był preparatem komercyjnym czy pochodził z izolatu roślinnego. Nie znalazłam również danych dotyczących ilości skrawków, ilości komórek nerwowych oraz liczby powtórzeń analizowanych preparatów. Zauważyłam też pewne nieścisłości, dotyczące rozcieńczeń stosowanych przeciwciał. W przypadku anti-AChE rekomendowane przez producenta rozcieńczenie to 1:20, podczas gdy w pracy zastosowano 1:1000 (analogicznie w przypadku anti- mAChRs-M1). W metodzie opisującej reakcję immunohistochemiczną znalazło się kilka niefortunnych sformułowań:

antygeny odmaskowywano – raczej odzyskiwano antygenowość
usunięcie podbarwienia tła – raczej zablokowanie niespecyficznej reakcji
gatunek zwierzęcia, na którym rozwinięto przeciwciało - raczej gatunek zwierzęcia, z którego pochodzi przeciwciało
przeciwciała pierwotne i wtórne – raczej przeciwciała pierwszo- i drugorzędowe
Użycie zwrotu „bufor trisowy” jest zbyt potoczne.

Wyniki zostały opracowane bardzo starannie i dokładnie. Liczne fotografie i tablice ułatwiają ich zrozumienie i przeanalizowanie. Większe powiększenie komórek przedstawionych na fotografiach umożliwiłyby precyzyjniejszą analizę lokalizacji badanych białek.

W obszernej dyskusji Doktorant konfrontuje uzyskane wyniki z danymi literaturowymi, zachowując odpowiednią dawkę krytycyzmu. Na stronie 96 pojawiło się sformułowanie „badania własne wykazały, że Reb A lub jego metabolity...” - metabolity nie były badane a tak wynika z kontekstu. Wnioski, podsumowujące uzyskane dane, zostały jasno sformułowane i odpowiadają wyznaczonym celom. Pracę kończy Streszczenie w języku polskim jak i angielskim oraz bogate piśmiennictwo, prawidłowo dobrane i zacytowane.

Podsumowując, Autor wykazał umiejętność samodzielnego rozwiązywania postawionych zadań naukowych, dobre opanowanie metod badawczych oraz znajomość literatury. Uzyskane przez Doktoranta wyniki stanowią Jego oryginalne osiągnięcie i poszerzają wiedzę o wpływie glikozydów stewiolowych na strukturę i funkcjonowanie układu nerwowego. Przedstawione uwagi krytyczne nie umniejszają wartości merytorycznej pracy.

Stwierdzam zatem, że przedstawiona do zaopiniowania praca doktorska Pana Karola Rycerza zatytułowana „**Wpływ doustnego podawania rebaudiozydu A na immunoreaktywność acetylocholinesterazy i receptorów muskarynowych M1 w neuronach hipokampa i prążkowie**” odpowiada warunkom określonym w art. 13 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki i wnoszę o dopuszczenie Kandydata do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Dr hab. Joanna Jakubowicz-Gil