



U n i w e r s y t e t M e d y c z n y w Ł ó d z i

Katedra i Klinika Neurologii

90-153 Łódź, ul. Kopcińskiego 22

Tel. +4842 677 6678
Fax. +4842 678 2293

email: kselmaj@afazja.am.lodz.pl

13 maja 2014

Opinia w sprawie dorobku naukowego i pracy habilitacyjnej dr Grzegorza Sulkowskiego

Dr Grzegorz Sulkowski jest absolwentem Wydziału Biologii Uniwersytetu Warszawskiego. Tytuł magistra uzyskał w roku 1992 na podstawie pracy pt. Wpływ ksantotoksyny na morfogenezę korzeni zarodkowych oraz na inicjację korzeni przybyszowych wybranych gatunków roślin, wykonanej w Zakładzie Anatomii i Cytologii Roślin. Następnie podjął pracę jako asystent w Zakładzie Serologii, Pracowni Immunologii Leukocytów i Płytek Krwi, Instytut Hematologii i Transfuzjologii w Warszawie. Od roku 1997 jest zatrudniony w Zakładzie Neurochemii, Pracowni Patobiochemii Ośrodkowego Układu Nerwowego, Instytutu Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN w Warszawie. Obecnie pracuje na stanowisku adiunkta specjalisty. Stopień doktora nauk medycznych w zakresie biologii medycznej uzyskał w Instytucie Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN w Warszawie w roku 2002. Tytuł rozprawy doktorskiej: „Wrażliwość zakończeń nerwowych mózgu szczura na całkowite niedokrwienie i przywrócenie krążenia.”

Praca naukowa poza pracą habilitacyjną.

Pracę naukową dr Sulkowski rozpoczął już w czasie studiów na Wydziale Biologii Uniwersytetu Warszawskiego. Dotyczyła ona cytotoksycznego wpływu ksantotoksyny na komórki merystematyczne korzeni przybyszowych wybranych gatunków roślin. Wykazał różną

wrażliwość gatunkową roślin na toksyczne działanie ksantotoksyny oraz obserwował mutagenne działanie ksantotoksyny. Ksantotoksyna powodowała również uszkodzenia wewnątrzkomórkowych błon: fragmentację siateczki śród plazmatycznej, zmniejszenie liczby dyktiosomów w aparacie Golgiego oraz uszkodzenia mitochondriów komórkowych.

Następnie w czasie pracy w Zakładzie Serologii, Pracownia Immunologii Leukocytów i Płytek Krwi, Instytut Hematologii i Transfuzjologii zajmował się usługowo typowanie komórek antygenami HLA, i był współautorem publikacji na temat leczenia przewlekłej małopłytkowości u dzieci za pomocą dożylnie podawanej immunoglobuliny anti-D oraz klinicznej skuteczności przetaczania koncentratów płytek krwi (KPK) u chorych z różnymi chorobami układu krwiotwórczego.

Po rozpoczęciu pracy w Instytucie Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN dr Sulkowski zajął się tematyką dotyczącą toksycznego wpływu ołowiu na ośrodkowy układ nerwowy. Badania dotyczące toksycznego oddziaływania ołowiu na OUN i były prowadzone na dwóch modelach zwierzęcych: ostrym i chronicznym. W obu tych modelach zaobserwowano podwyższony poziom ołowiu we krwi i w mózгах narażonych szczurów. Badania nad neurotoksycznością ołowiu doprowadziły do kilku publikacji ze współautorstwem dr Sulkowskiego, które dotyczyły zaburzeń w transporcie (wychwycie i uwalnianiu) dopaminy w zakończeniach nerwowych, zmian w kinetyce wiązania ligandu do receptorów dopaminowych D₂ i podwyższonego poziomu glutationu GSH. Opisano też podwyższenie aktywności enzymów powiązanych z metabolizmem glutationu (γ -GCS - syntetazy γ -glutamylcysteiny i GST – S-transferazy glutationu). Interesujące były też obserwacje dotyczące zmiany w aktywności jednego z enzymów mielinowych, CNP-azy i dalsze obserwacje na temat patologii mieliny i oligodendrocytów w wyniku ekspozycji na działanie ołowiu. Dr Sulkowski opisał dezintegrację i przerwanie ciągłości otoczki mielinowej i wykazał zmiany morfologiczne w oligodendrocytach.

Kolejnym zagadnieniem naukowym, którym dr Sulkowski zajmował się w Instytucie Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN były badania nad mechanizmami niedokrwienia mózgu i reperfuzji, które zaowocowały pracą doktorską. Badania te dotyczyły oceny zmian morfologicznych, metabolicznych i funkcjonalnych w zakończeniach nerwowych mózgu i mitochondriach synaptycznych wywołanych całkowitym niedokrwieniem mózgu oraz w warunkach reperfuzji. Poza zmianami morfologicznymi dr Sulkowski opisał również zaburzenia metaboliczne w synaptosomach, przede wszystkim spadek ATP i CrP oraz wzrost poziomów ADP i Cr oraz obniżenie zawartości glutationu całkowitego w mózgu podczas ischemii i

reperfuzji. W badaniach nad niedokrwieniem mózgu stwierdzono zaburzenia neurotransmiterów, w szczególności obniżenie uwalniania dopaminy z zakończeń nerwowych. Obserwowano również zaburzenia kinetyczne wiązania ligandów do receptora dopaminowego D2. Uzyskane wyniki pozwoliły na postawienie hipotezy o większej wrażliwości neuronów dopaminergicznych na warunki ischemii/reperfuzji niż neuronów GABA-ergicznych. Dr Sulkowski opisał również szereg zaburzeń biochemicznych i molekularnych w warunkach niedokrwienia i reperfuzji mózgu. Takich jak wzrost poziomu kalpajny oraz obniżenie poziomu białek cytoszkieletu komórki: MAP-2 i fodryny.

Ostatecznie dr Sulkowski zainteresował się patologią autoimmunologicznej demielinizacji i rozpoczął badania z wykorzystaniem modelu szczurzego autoimmunologicznego zapalenia mózgu i rdzenia. W szczególności prowadził badania nad znaczeniem toksycznego działania glutaminianu w mechanizmach tej choroby. Badania te są przedmiotem postępowania habilitacyjnego i będą omówione poniżej. Poza badaniami nad rolą glutaminianu dr Sulkowski brał udział w pracach oceniających aktywność układu purinergicznego w autoimmunologicznym zapaleniu mózgu i rdzenia.

Łącznie dr Sulkowski jest współautorem 17 prac indeksowanych w których opisano wyniki badań nie będących przedmiotem postępowania habilitacyjnego. Całkowity *impact factor* tych prac wynosi 31.481. Dr Sulkowski jest pierwszym autorem tylko w 5 z tych prac. Z tego powodu moja ocena osiągnięć naukowych habilitanta jest dość umiarkowana.

Ocena pracy habilitacyjnej

Postępowanie habilitacyjne dotyczy czterech publikacji indeksowanych, z których dr Sulkowski jest pierwszym autorem w trzech. Łączny *impact factor* tych prac wynosi 10,612. Cały cykl została nazwany „Rola ekscytotoksyczności glutaminianu w patogenezie autoimmunologicznego zapalenia mózgu i rdzenia kręgowego (EAE) szczura – badanie potencjału neuroprotekcynowego antagonistów receptorów glutaminianergicznych.”

Zagadnienie roli glutaminianu w patogenezie autoimmunologicznej demielinizacji zostało podniesione kilkanaście lat temu. W piśmiennictwie jest bardzo wiele publikacji dotyczących tego tematu. Nowym elementem, który pojawia się w pracy habilitacyjnej dr Sulkowskiego jest wykorzystanie inhibitorów receptorów glutaminergicznych w ocenie ich wpływu na rozwój autoimmunologicznego zapalenia mózgu i rdzenia u szczurów (*experimental autoimmune*

encephalomyelitis – EAE). W cyklu prac, które stanowią postępowanie habilitacyjne, dr Sulkowski opisał wpływ inhibitorów receptorów NMDA, amantadyny i memantyny, i inhibitorów receptorów mGluR, na ekspresję cytokin prozapalnych w mózgu zwierząt chorujących na EAE (*Journal of Neuroimmunology*, 2013, 261: 67-76). Stwierdził hamujący wpływ na poziomie transkrypcji i brak takiego wpływu na poziomie ekspresji białka. W drugiej publikacji (*BioMed Research International*) oceniono wpływ amantadyny i memantyny oraz anatgoinistów mGluR na przebieg kliniczny EAE. Amantadyna i memantyna wywierały neuroprotektoryjny efekt na rozwój choroby i hamowały pojawianie się deficytów neurologicznych oraz poprawiały ogólny stan leczonych zwierząt. Antagoniści receptorów mGluR G I (LY 367385 i MPEP) nie wykazywali działania protekcyjnego na rozwój deficytów neurologicznych w przebiegu EAE. Należy jednak stwierdzić, że wpływ hamowania receptorów NMDA wykazał bardzo umiarkowany efekt na rozwój EAE. Wyniki eksperymentów wykazały, że podanie zarówno amantadyny jak i memantyny powodowało jedynie 1-2 dniowe opóźnienie pojawiania się deficytów neurologicznych oraz skrócenie czasu trwania ostrej fazy choroby też o 1-2 dni. Nie zaobserwowano natomiast pozytywnego efektu terapeutycznego po podaniu zwierzętom EAE antagonistów receptorów metabotropowych mGluR G I (MPEP i LY 367385) W pracy tej potwierdzono też istotny wzrost ekspresji receptorów glutaminergicznych, zarówno jonowych jak i metabotropowych w trakcie rozwoju EAE. W trzeciej publikacji (*Folia Neuropathologica*, 2009; 47(4): 327-337) wykazano u zwierząt z EAE zwiększony wychwyt glutaminianu z przestrzeni zewnętrznej, zarówno w przypadku frakcji synaptosomalnej, jak i frakcji błonowej pęcherzyków pochodzenia astrocytarnego. Zanotowano również zwiększone uwalnianie glutaminianu z obu frakcji o około 20% po depolaryzacji błon. Obserwowane zmiany w transporcie glutaminianu zinterpretowano jako dowód na zwiększenie poziomu glutaminianu w przestrzeniach synaptycznych. W ostrej fazie EAE zaobserwowano zwiększony poziom ekspresji białek: transporterów glutaminianu (GLT-1, EAAC1), metabotropowych glutaminianergicznych receptorów grupy I (mGluR 1 i mGluR5). W czwartej publikacji cyklu habilitacyjnego (*Neuroscience*, 2008, 155: 45-52) oceniono ekspresję białek transporterowych w astrocytach (GLT-1) i w neuronach (EAAC1) w szczycie choroby EAE. Poziom ekspresji mRNA dla transporterów GLT-1 i GLAST oznaczany w różnych strukturach mózgowia wzrastał o 90-150% powyżej wartości kontrolnych i był skorelowany z nasileniem deficytów neurologicznych u zwierząt EAE. Ekspresja białka transportera GLAST była niezmienną. Poziom mRNA dla transporterów GLT-1 i GLAST oznaczany w różnych strukturach mózgowia wzrastał powyżej wartości kontrolnych i był skorelowany z nasileniem się deficytów neurologicznych u zwierząt EAE. Nie zaobserwowano korelacji czasowej pomiędzy ekspresją mRNA i poziomem białek badanych transporterów. Odnotowano obniżenie ekspresji białka transportera GLAST oraz

transportera GLT-1 . Obserwowane zmiany w ekspresji mRNA i białek badanych transporterów świadczą według autorów o ich zaangażowaniu w regulację poziomu glutaminy w przebiegu patologii EAE.

Pewnym niedostatkiem cyklu prac postępowania habilitacyjnego jest brak analizy patologicznej OUN zwierząt chorujących na EAE i poddanych ekspozycji inhibitorów receptorów glutaminergicznych. Wnioskowanie odnośnie korzystnego blokowania receptorów NMDA na przebieg EAE opiera się na obserwacjach klinicznych. Dodatkowo wpływ inhibitorów NMDA na ekspresję objawów neurologicznych był bardzo umiarkowany, jedynie 1-2 dniowe przesunięcie początku i zakończenia choroby. Dlatego bardzo korzystne, jeżeli nie konieczne, byłoby ocenienie wpływu tych inhibitorów na zakres zmian patologicznych w mózgu i rdzeniu szczurów, stopień reakcji zapalnej, wielkość i rodzaj nacieków komórkowych, zakres uszkodzenia mieliny, stopień aktywacji komórek mikrogleju i astrocytów. Dodatkowo taka analiza umożliwiłaby porównanie siły działania hamującego EAE, zależnego od inhibitorów glutaminergicznych, z innymi mechanizmami hamowania EAE. Choroba ta może być hamowana na różnych drogach i istotne jest odniesienie uzyskanych wyników do znanych mechanizmów kontrolujących EAE. W celu potwierdzenia wpływu inhibitorów NMDA na hamowanie EAE dr Sulkowski wykazał ich hamujący wpływ na ekspresję kilku cytokin prozapalnych i chemokin. Ale jest to analiza pośrednia i dość wybiórcza, ponieważ rola tych mediatorów zapalenia w EAE może być wielokierunkowa, a wpływ na EAE nie koniecznie wspierający np. TNF. Ponadto tak skonstruowane doświadczenia sugerują, iż zahamowanie receptorów NMDA ma działanie immunomodulujące, a w pozostałych pracach cyklu głównie badano ekspresję i zachowanie się receptorów glutaminergicznych w komórkach glejowych i neuronach. W jaki więc sposób zablokowanie receptorów NMDA na komórkach endogennych OUN ogranicza objawy kliniczne EAE ? W celu rozróżnienia tych dwóch mechanizmów działania celowe byłoby wyizolowanie komórek zapalnych z OUN zwierząt chorych na EAE i ocena ich funkcji w warunkach zablokowania receptorów NMDA. Istnieje doniesienie o ekspresji receptorów NMDA na komórkach układu immunologicznego i o bezpośrednim udziale NMDA w reakcjach immunologicznych.

Ocena całościowa

W sumie uważam, iż cykl prac postępowania habilitacyjnego dotyczy interesującego i ważnego zagadnienia naukowego rozwijanego w badaniach naukowych ostatnich lat. Uzyskane wyniki dostarczają nowych informacji, aczkolwiek siła wnioskowania byłaby większa z

wykorzystaniem szerszego i bardziej kompletnego modelu doświadczalnego. Cztery prace cyklu habilitacyjnego zostały opublikowane w czasopiśmie o średniej sile oddziaływania (łączny IF 10,612). Z umiarkowanym entuzjazmem wnoszę do Rady Naukowej Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN o kontynuowanie dalszych etapów procesu habilitacyjnego.

Krzysztof Selmaj