



Kraków, 17-08-2023

dr hab. Agnieszka Nikiforuk
Zakład Badań Nowych Leków
Instytut Farmakologii im. Jerzego Maja PAN
ul. Smętna 12
31-343 Kraków

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Aleksandry Zawadzkiej zatytułowanej:

"Wpływ aktywacji układu odpornościowego matki we wczesnej ciąży na funkcję i strukturę mitochondriów w mózgu potomstwa w zwierzęcym modelu zaburzeń ze spektrum autyzmu"

Przedstawiona do oceny praca doktorska Pani mgr Aleksandry Zawadzkiej wykonana pod kierunkiem Promotora Pani prof. dr hab. Agaty Adamczyk oraz Promotora pomocniczego Pani dr Magdaleny Cieślik bardzo dobrze wpisuje się w aktualny nurt badań dotyczących patogenezy zaburzeń neurorozwojowych. Biorąc pod uwagę kluczowe znaczenie wydajności mitochondriów dla prawidłowego funkcjonowania mózgu nie tylko w życiu płodowym, ale i w późniejszych etapach rozwoju, celem badań mgr Zawadzkiej była weryfikacja hipotezy, iż w zaburzeniach ze spektrum autyzmu wywołanych aktywacją układu odpornościowego matki we wczesnej ciąży dochodzi do nieprawidłowości w funkcjonowaniu mitochondriów i zaburzeń metabolizmu energetycznego w mózgu.

Układ przedłożonej rozprawy doktorskiej jest typowy dla prac doświadczalnych. Rozprawa zawiera 195 stron, 54 ryciny oraz 7 tabel. Zasadniczą część pracy stanowią typowe rozdziały jak Wstęp, Założenia i cel pracy, Materiały i metody, Wyniki, Dyskusja, Wnioski oraz Spis piśmiennictwa. Kluczowe rozdziały poprzedza spis treści, a także wykaz rycin i tabel. Praca zawiera także Streszczenie (po polsku i po angielsku), alfabetyczny wykaz stosowanych skrótów oraz ujętą w trzech punktach Innowacyjność rozprawy. Układ pracy doktorskiej jest przejrzysty, a praca jest starannie przygotowana zarówno pod względem merytorycznym, jak i graficznym czy językowym. Na uwagę zasługuje również bardzo bogata bibliografia obejmująca 431 pozycji literaturowych.

Napisany w przystępny i klarowny sposób Wstęp stanowi obszerne wprowadzenie w tematykę pracy stanowiąc jednocześnie uzasadnienie hipotezy badawczej i realizowanych przez Autorkę celów. Przedmiotem pierwszego rozdziału Wstępu jest charakterystyka zaburzeń ze spektrum autyzmu (ASD). W kolejnych podrozdziałach został przedstawiony ogólny obraz kliniczny zaburzeń, a także najnowsze informacje dotyczące diagnostyki i klasyfikacji tego schorzenia. Opisując epidemiologię zaburzeń ze spektrum autyzmu, Autorka zwróciła uwagę na znaczny wzrost liczby osób z diagnozą ASD w ciągu ostatnich lat, a także na istnienie tak zwanego kobiecego fenotypu autyzmu. Podrozdział dotyczący etiologii autyzmu podkreśla wieloczynnikowy charakter rozwoju tego schorzenia, w którym odgrywają rolę zarówno czynniki genetyczne, jak i środowiskowe, w tym aktywacji układu odpornościowego matki (MIA) w odpowiedzi na infekcje bakteryjne lub wirusowe na wczesnych etapach ciąży. We Wstępie zostały też opisane różne rodzaje zwierzęcych modeli autyzmu, ze szczególnym uwzględnieniem modeli MIA.

Kolejny rozdział Wstępu został poświęcony funkcjonowaniu układu odpornościowego w ciąży. Rozdział ten zawiera obszerny opis roli cytokin zarówno w rozwoju i utrzymaniu ciąży, jak i w trakcie infekcji. Opis mechanizmu działania cytokin prozapalnych, m.in. IL-6, IL-1 β i TNF- α , został wzbogacony poglądowymi rycinami. Autorka porusza także zagadnienia związane z rolą mikrogleju oraz stresu oksydacyjnego w rozwoju zaburzeń ze spektrum autyzmu.

Ostatni rozdział Wstępu dotyczy roli, jaką pełnią mitochondria w ośrodkowym układzie nerwowym. Opisany został udział tych organelli w generacji wolnych rodników tlenowych. Osobne podrozdziały dotyczą dynamiki, a także mitofagii i biogenezy mitochondriów. Zamknięcie Wstępu stanowi opis potencjalnego związku mitochondriów z rozwojem zaburzeń ze spektrum autyzmu. Autorka, wskazując na związki pomiędzy zaburzeniami mitochondrialnymi a autyzmem, zwróciła także uwagę na brak dostępnych danych dotyczących funkcjonowania mitochondriów w mózgu potomstwa matek narażonych na infekcje w ciąży.

Kolejną część rozprawy stanowią Założenia i cel pracy. Autorka, kierując się przesłankami przedstawionymi we Wstępie rozprawy, przedstawiła szczegółowe cele podjętych przez siebie badań. Obejmowały one zbadanie wpływu aktywacji układu odpornościowego matki we wczesnej ciąży na (1) strukturę i funkcjonowanie mitochondriów oraz (2) procesy prozapalne i markery stresu oksydacyjnego w mózgu osesków oraz młodych zwierząt, a także na (3) występowanie związanych z autyzmem zachowań.

Metody badawcze zastosowane przez Autorkę przy realizacji postawionych sobie celów zostały przedstawione w klarowny sposób. W rozdziale Materiały i metody Doktorantka opisuje zwierzęta doświadczalne oraz zastosowany model aktywacji układu odpornościowego matki wywoływany poprzez jednorazowe dootrzewnowe podanie lipopolisacharydu w 9,5 dniu ciąży. Następnie scharakteryzowana jest procedura izolacji mitochondriów, analiza poziomu ekspresji genów, a także metody spektrofotometryczne, immunochemiczne, spektrofluorymetryczne, luminescencyjne oraz mikroskopowe. Opisane zostały także zastosowane w badaniach testy behawioralne. Szczegółowych informacji dostarczają załączone tabele przedstawiające m.in. wykorzystywane sondy TaqMan, składy buforów, czy warunki reakcyjne dla badanych białek.

Wyniki zostały przedstawione w usystematyzowany sposób w 10 podrozdziałach. Rezultaty badań molekularnych dotyczyły kolejno tkanki płodowej, mózgu osesków oraz kory mózgu i hipokampa młodych zwierząt. Osobny opis stanowiły wyniki badań behawioralnych wykonywanych na oseskach oraz młodych zwierzętach. Uzyskane wyniki zostały w przejrzysty sposób przedstawione na 45 rycinach

opatrzonych czytelnymi legendami. Każdy z podrozdziałów zawiera zwięzłe podsumowanie i interpretację uzyskanych wyników.

Badania tkanki płodowej z grupy MIA wykazały wzrost ekspresji genów dla kluczowych cytokin prozapalnych, a także poziomu białka będącego markerem mikrogleju. Kolejne badania dotyczące oceny stresu oksydacyjnego wskazały na zwiększoną generację reaktywnych form tlenu (RFT). Co istotne, aktywacja układu odpornościowego matki powodowała wzrost aktywności oksydazy NADPH i zwiększoną ekspresję genu dla izoformy NOX2. Analiza funkcji mitochondriów w tkance płodowej wykazała znaczący spadek mitochondrialnego potencjału błonowego ($\Delta\Psi_m$) oraz poziomu ATP. Podsumowując uzyskane wyniki, Autorka wskazała, że zależny od MIA rozwój procesów prozapalnych oraz aktywacja oksydazy NADPH i uwalnianie anionorodnika ponadtlenkowego mogą być odpowiedzialne za uszkodzenia mitochondriów już w czasie życia płodowego.

Kolejne badania wykazały, że również w mózgu 7-dniowych osesków z grupy MIA dochodzi do wzrostu ekspresji cytokin prozapalnych, wzrostu aktywności oksydazy NADPH oraz podwyższenia poziomu RFT. Odnotowanym zmianom mitochondrialnego potencjału błonowego oraz spadku produkcji ATP nie towarzyszyły jednak zaburzenia funkcji łańcucha oddechowego. Nie odnotowano także wpływu MIA na dynamikę, biogenezę oraz autofagię mitochondriów. Brak zmian w ilości mitochondriów skłonił Autorkę do sugestii, że nieefektywnie funkcjonujące mitochondria nie są usuwane, a wśród mitochondriów obecnych w tkance istnieje pula organelli o obniżonym potencjale błonowym.

Ciekawych wyników dostarczyły badania mózgu młodych zwierząt potomnych. Wykazano, że aktywacja układu odpornościowego matki wywołuje zmiany w ekspresji cytokin prozapalnych nie tylko w tkance płodowej, czy mózgu osesków, ale również na późniejszych etapach życia potomstwa, a kora mózgu wydaje się strukturą bardziej podatną na wpływ MIA niż hipokamp. W korze mózgu zaobserwowano także wzrost ekspresji genu dla cyklooksygenazy-2 i lipoksygenazy oraz aktywację mikrogleju. Wykazano także, że w mózgu młodych zwierząt po prenatalnej ekspozycji na MIA wzrasta poziom RFT. Zmianom tym towarzyszy spadek ekspresji genów związanych z systemem antyoksydacyjnym oraz wzrost poziomu stresu oksydacyjnego wyrażony spadkiem stosunku zredukowanej postaci glutationu do jego formy utlenionej. Co istotne wzrost aktywności oksydazy NADPH odnotowano jedynie w hipokampie. Autorka również zaobserwowała, że w miarę dojrzewania zwierząt z grupy MIA zaburzenia mitochondrialne ulegają pogłębieniu. U 52-dniowych szczurów wykazano nie tylko obniżenie mitochondrialnego potencjału błonowego oraz spadek poziomu ATP, ale także zaburzenie funkcjonowania łańcucha transportu elektronów. Odnotowano również zaburzenia dynamiki tych organelli z przechyleniem szali w kierunku fragmentacji. Analiza poziomu kluczowych białek zaangażowanych w usuwanie dysfunkcyjnych mitochondriów na drodze autofagii wykazała brak aktywacji tego procesu w mózgu zwierząt MIA, co jak konkluduje Autorka, w obliczu znacznego uszkodzenia funkcji mitochondriów i ich zwiększonej fragmentacji, może oznaczać, że dochodzi do akumulacji tych dysfunkcyjnych organelli. Do zmniejszenia puli funkcjonalnych mitochondriów wydają się również przyczyniać zaburzenia procesu biogenezy tych organelli. Dane molekularne zostały uzupełnione o analizę ultrastruktury mitochondriów, która wskazała na liczne zmiany u zwierząt MIA w stosunku do grupy kontrolnej.

Dodatkowym elementem prowadzonych badań była ocena zmiany zachowania u osesków i starszych zwierząt. Uzyskane wyniki wskazały na zaburzenia emisji ultradźwięków u osesków z grupy

MIA w odpowiedzi na izolację od matki. U młodych zwierząt potomnych z grupy MIA również zidentyfikowano problemy w interakcjach społecznych.

Autorka, opisując innowacyjność rozprawy, podkreśliła, że przedstawione badania po raz pierwszy wykazują, że aktywacja układu odpornościowego matki w ciąży zaburza funkcjonowanie mitochondriów w mózgu potomstwa w sposób zależny od etapu rozwoju i struktury mózgu. Za zmiany te wydaje się po części odpowiadać aktywacja oksydazy NADPH i zwiększona produkcja anionorodnika ponadtlenkowego w życiu płodowym. Zaburzeniom funkcjonalnym towarzyszą uszkodzenia ultrastruktury mitochondriów.

Istotną częścią rozprawy jest Dyskusja, w której Doktorantka niezwykle płynnie porusza się w zagadnieniach związanych z tematyką pracą. Doktorantka nie tylko jasno interpretuje wnioski wynikające z własnych badań, ale także obszernie argumentuje, w jaki sposób jej badania wpisują się w dotychczasowy stan wiedzy. Spójna interpretacja wyników w odniesieniu do obszernej bazy literatury świadczy o dojrzałości naukowej Doktorantki. Podsumowanie pracy stanowią zwięźle sformułowane Wnioski.

Całokształt rozprawy doktorskiej oceniam bardzo wysoko. Mam jednak pewne uwagi i pytania, które mimo wszystko nie umniejszają wartości pracy.

Szkoda, że w przeprowadzonych eksperymentach nie uwzględniono samic. Sama Doktorantka zwraca we Wstępie uwagę na zagadnienia związane z manifestacją ASD u płci żeńskiej. Przeprowadzenie eksperymentów również na samicach dostarczyłoby niewątpliwie cennych informacji, chociażby o ewentualnych czynnikach protekcyjnych. Same zmiany hormonalne nie są wystarczającym powodem do wyłączenia samic, tym bardziej że badania prowadzone były na oseskach i dojrzewających zwierzętach. Łatwo zresztą ocenić fazę cyklu.

Druga uwaga dotyczy samych badań behawioralnych. Brakuje tutaj oceny powtarzalnych zachowań, które są jednym z kluczowych objawów autyzmu.

Szkoda, że schemat eksperymentu nie pozwolił na korelację markerów molekularnych z nasileniem objawów behawioralnych ASD. Zakładając zróżnicowaną reaktywność zwierząt (np. USV), takie analizy dostarczyłyby cennych informacji.

Nie została podana całkowita liczba miotów (zarówno MIA, jak i kontrolnych), jaka została użyta w prowadzonych eksperymentach. Nie jest też stwierdzone czy w danym badaniu były uwzględnione osobniki z różnych miotów i (jakiej liczby miotów).

Nie jest do końca jasne, do czego odnosi się liczebność grupy opisana jako liczba eksperymentów. Czy N jest liczbą osobników uwzględnionych w danym eksperymencie?

Doktorantka mogłaby pokusić się o zbiorcze zestawienie wyników (np. w formie tabeli) pozwalające na przejrzyste porównanie charakteru zmian badanych markerów na różnych etapach życia potomstwa MIA.

Podsumowując, recenzowana rozprawa doktorska Pani mgr Aleksandry Zawadzkiej w pełni realizuje założone cele pracy przy pomocy adekwatnych metod badawczych. Na uwagę zasługuje nie tylko szeroki warsztat metodologiczny Doktorantki, ale także umiejętna analiza, interpretacja i dyskusja uzyskanych wyników. Rezultaty przeprowadzonych przez mgr Zawadzką badań wnoszą istotny wkład w poznanie roli mitochondriów w przebiegu zaburzeń neurorozwojowych związanych z aktywacją układu immunologicznego w czasie ciąży. Warto podkreślić, że część wyników przedstawionych w pracy doktorskiej została opublikowana w czasopiśmie o międzynarodowym zasięgu, a w jednej z prac Doktorantka jest pierwszym równorzędnym autorem.

Uważam, że rozprawa doktorska Pani Aleksandry Zawadzkiej zatytułowana „*Wpływ aktywacji układu odpornościowego matki we wczesnej ciąży na funkcję i strukturę mitochondriów w mózgu potomstwa w zwierzęcym modelu zaburzeń ze spektrum autyzmu*” spełnia określone ustawowo warunki stawiane rozprawie doktorskiej. W związku z powyższym zwracam się do Rady Naukowej Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego PAN w Warszawie o dopuszczenie Pani mgr Aleksandry Zawadzkiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego wszczętego w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu, w dyscyplinie nauki medyczne.



Agnieszka Nikiforuk