

Recenzja Pracy doktorskiej mgr Aleksandry Zawadzkiej pt. „Wpływ aktywacji układu odpornościowego matki we wczesnej ciąży na funkcję i strukturę mitochondriów w mózgu potomstwa w zwierzęcym modelu zaburzeń ze spektrum autyzmu”

Jeszcze kilka lat temu do umieszczenie publikacji w najbardziej prestiżowych pismach biologicznych niezbędne było, aby pomiary wykonywano kilkoma alternatywnymi metodami. Dziś to nie wystarcza. Obecnie do publikacji w tych pismach niezbędne jest nie tylko to, ale także, aby procesy opisywane były z punktu widzenia wielu dziedzin naukowych, a co najmniej dyscyplin lub subdyscyplin naukowych. Takie wymagania redakcyjne sprawiają duże wymagania przed recenzentami prac zgłoszonych do publikacji w tych magazynach naukowych. Rzadko bowiem dany recenzent obejmuje swoją ekspertyzą cały zakres publikacji.

Podobne wyzwanie zostało postawione przed recenzentami rozprawy doktorskiej mgr Aleksandry Zawadzkiej. Opisuje ona badania, w których krzyżują się wątki bioenergetyki biochemicznej, fizjologii komórki, fizjologii organizmu, rozwoju organizmu, behawioru i zaburzeń neurorozwojowych. Od doktorantki przygotowanie takiej pracy wymagało opanowanie wielu różnych technik badawczych i interpretacji wyników tych tak różnych dziedzinowo doświadczeń. Było to zadanie trudne i niezwykle ambitne. W mojej opinii z tego zadania doktorantka wywiązała się dobrze. Co więcej, jej sprawne poruszanie się wśród tak wielu wątków naukowych sprawia, że trudno byłoby mi powiedzieć w którym z nich czuje się ona najbardziej kompetentna. Z chęcią wysłuchałbym Jej opinii w tej sprawie.

W tej sytuacji muszę zaznaczyć, że moim polem ekspertyzy jest biochemia i fizjologii mitochondriów. Dlatego na tym zakresie rozprawy mgr Aleksandry Zawadzkiej skupię się przede wszystkim w swojej recenzji. Tym niemniej wątki rozprawy z zakresu fizjologii organizmu, rozwoju organizmu, behawioru i zaburzeń neurorozwojowych w mojej opinii zostały opisane ciekawie i przekonująco. Wskazuje to na wszechstronność i już osiągniętą dojrzałość naukową doktorantki.

Przechodzę teraz do opisów i interpretacji doświadczeń z zakresu mojej ekspertyzy, to jest biochemii i fizjologii mitochondriów. Materiał do badań w tym zakresie pochodził od szczurów urodzonych w wyniku ciąży przebiegającej bez zakłóceń i od szczurów urodzonych w wyniku ciąży, w trakcie której nastąpił epizod silnej aktywacji układu odpornościowego. Aktywacja ta została wywołana dootrzewnowym podaniem w połowie dziewiątego dnia ciąży lipopolisacharydu z *Escherichia coli* (LPS). Podanie tej składowej bakteryjnego patogenu wywołało nie tylko aktywację układu odpornościowego, ale też wyraźne zmiany w funkcjonowaniu organizmu ciężarnej. Po podaniu LPS zaobserwowano u ciężarnych samic zmniejszenie ruchliwości, półprzymknięcie oczu, zmniejszoną reaktywność na bodźce, a także przejściowe obniżenie temperatury ciała i znaczące zmniejszenie ilości pobieranej wody. Jak wykazała doktorantka podanie LPS w trakcie ciąży miało też konsekwencje odnośnie rozwoju miotu. Oseki i młode szczury rozwijały się w sposób odmienny od osesków i młodych szczurów urodzonych przez matki, których ciąża przebiegała bez zakłóceń. Nie tylko w ich zachowaniu, ale także na poziomie komórkowym zauważono różnice. Przedmiotem szczególnej analizy były mitochondria wyizolowane z mózgów siedmiodniowych szczurów i mózgów 52 -54 dniowych szczurzych samców. Z tych ostatnich oddzielnie analizowano mitochondria wyizolowane z kory mózgowej i hipokampu.

Jednym z głównych celów pracy było zbadanie jak aktywacja układu odpornościowego we wczesnej ciąży wpływa na strukturę i funkcje mitochondriów w mózgu potomstwa urodzonego przez matkę, która doświadczyła takiej aktywacji. Doktorantka w swych badaniach ograniczyła się jedynie do badań tkanki mózgowej. Myślę, że ciekawym pytaniem byłoby także to, jak specyficzna jest to reakcja względem tkanki mózgowej. Czy aktywacja układu odpornościowego we wczesnej ciąży wpływa na strukturę i funkcje mitochondriów również w innych tkankach? Zapewne takie pytanie postawiliby recenzenci czołowych pism biologicznych. Tego typu doświadczenia pozwoliłyby również wykluczyć możliwość, że anomalie w behawiorze zaobserwowane u szczurów urodzonych przez matki, które w ciąży doświadczyły aktywacji układu odpornościowego, wynikają raczej lub także ze złego funkcjonowania innych niż mózg tkanek lub organów np. wątroby, nerek czy jelit.

W swojej pracy doktorantka przebadła szeroki wachlarz parametrów mitochondriów wyizolowanych z mózgu lub jego kory czy hipokampa. Wśród tych parametrów analizowano: aktywność oksydazy NADPH, poziom utlenionej i zredukowanej formy glutationu, aktywności wszystkich, to jest I, II, III i IV, kompleksów mitochondrialnego łańcucha oddechowego, aktywność syntazy cytrynianowej, wysokość mitochondrialnego potencjału błonowego, poziom ATP, poziom wolnych rodników tlenowych, poziom anionorodnika ponadtlenkowego. Do pomiarów większości z tych parametrów doktorantka użyła komercyjnych zestawów (kitów). W takim przypadku należy pamiętać, że komercyjne kity zostały opracowane zwykle z myślą o typowych i najbardziej powszechnych modelach badawczych. Do pomiarów dokonywanych na modelach bardziej specyficznych mogą być one nieadekwatne, a ich wyniki mogą być nieprecyzyjne, a nawet wypaczone. Dlatego do badania określonego parametru zaleca się w takim przypadku korzystanie w kilku alternatywnych kitów. W pracy posługiwano się przy pomiarze danego parametru zazwyczaj tylko jednym z dostępnych kitów.

Drugą niedogodnością stosowania gotowych kitów jest pokusa bardzo skrótowego opisu danej metody. W takim opisie opartym głównie na instrukcji producenta danego kitu umyka zwykle szereg istotnych szczegółów. Dla przykładu, przy izolacji mitochondriów z użyciem *Mitochondrial isolation kit* firmy Sigma-Aldrich w opisie metody nie podano ile cykli wirowań 600 x g i 11 000 x g było zastosowanych. Podobnie mają się sprawy przy opisie kilku innych metod. Są one zwykle skrótowe. Dla przykładu, opis pomiarów potencjału błonowego w izolowanych mitochondriach wymaga doprecyzowania. Zestawu jakiego producenta użyto? Zapewne Sigmy, która sprzedaje zestaw do pomiaru potencjału w izolowanych mitochondriach oparty na JC-1. Jakie było stężenie sondy JC-1 w mieszaninie reakcyjnej? Czy wykonano kontrole z użyciem związków powodujące depolaryzację lub hiperpolaryzację mitochondriów? Przy pomiarach $\Delta\Psi$ mitochondriów kontrole takie są bardzo istotne dla prawidłowej oceny wielkości obserwowanych zmian. Ponadto, w opisie metody doktorantka wspomina, że "stosunek fluorescencji zielonej do czerwonej odzwierciedla poziom $\Delta\Psi_m$ ", podczas gdy w badaniach mierzono jedynie fluorescencję czerwoną. Ta rozbieżność wymaga wyjaśnienia.

Przechodząc do „mitochondrialnych” wyników pracy. Jeśli chodzi o pomiary dokonane na mitochondriach kontrolnych i tych wyizolowanych z miotów urodzonych po podaniu ciężarnym samicom LPS największe różnice zaobserwowano w mitochondrialnym potencjale błonowy, poziomie wolnych rodników tlenowych i ATP. Te trzy parametry są niezwykle ściśle kontrolowane na poziomie komórkowym i utrzymywane na względnie stałym poziomie. Ich odstępstwo od normy prowadzi do szeregu dysfunkcji komórki i inicjuje wiele jej stanów patologicznych, łącznie z apoptozą czy nekrozą. Co więcej, te trzy parametry są ze sobą ściśle powiązane i zaburzenie w jednym z nich generuje zmiany i pozostałych. Najogólniej rzecz ujmując wysoki mitochondrialny potencjał błonowy jest warunkiem prawidłowego

funkcjonowania mitochondrialnego enzymu generującego ATP (F_1F_0 -ATP synthase/ATPase). Prawidłowy poziom potencjału błonowego jest warunkiem sprawnej syntezy ATP w procesie oksydacyjnej fosforylacji. Depolaryzacja mitochondrialnego potencjału błonowego sprawia, że synteza ATP związana z oksydacyjną fosforylacją ustaje. Z kolei hiperpolaryzacja mitochondrialnego potencjału błonowego prowadzi do wzrostu szybkości generowanie reaktywnych form tlenu w łańcuchu oddechowym, a depolaryzacja do obniżenia tej szybkości. Dlatego mitochondrialny potencjał błonowy jest tak ściśle regulowany. Konsekwencją tego jest też względnie stały poziom ATP i reaktywnych form tlenu w komórce.

Pomiary przeprowadzone przez doktorantkę wskazują, że w preparatach mitochondriów wyizolowanych z osesków i młodych szczurów urodzonych w wyniku ciąży w trakcie której podano dootrzewnowo LPS poziom mitochondrialnego potencjału błonowego jest obniżony (ryciny 18, 28 i 44), a poziom reaktywnych form tlenu podwyższony (ryciny 23 i 39) w porównaniu z mitochondriami wyizolowanymi z osesków i młodych szczurów urodzonymi w wyniku prawidłowej ciąży. Jest to zaskakujący wynik, gdyż depolaryzacja powinna raczej prowadzić do obniżenia poziomu reaktywnych form tlenu. Pomiary reaktywnych form tlenu przeprowadzono dwoma metodami i obie dały podobne wyniki. Natomiast tak kluczowy dla wyników pracy parametr, jak mitochondrialny potencjał błonowy był mierzony tylko jedną metodą. Poza metodą z zastosowaniem sondy fluorescencyjnej JC-1 opracowano metody wyznaczania poziomu mitochondrialnego potencjału błonowego także innymi sondami fluorescencyjnymi, na przykład: rodamina 123, DiOC6, TMRM, TMRE, NAO, safranina O, merocyjanina 540 czy JC-9. Każda z tych metod ma swoje zalety i ograniczenia. Na szczęście te ograniczenia są różne. Dlatego najlepiej badanie tego mitochondrialnego parametru wykonywać co najmniej przy pomocy dwóch sond fluorometrycznych. Co więcej, jak już uprzednio wzmiankowałem przy pomiarze poziomu mitochondrialnego potencjału

błonowego przy pomocy JC-1 nie wykonano potrzebnych pomiarów kontrolnych i nie zbadano wpływu walinomycyny czy oligomycyny na ten parametr. Bez takich kontroli trudno jest oszacować zakres obserwowanych zmian mitochondrialnego potencjału błonowego.

Z kolei obserwowane zmiany w poziomie ATP są zgodne z kierunkiem zmian w mitochondrialnym potencjale błonowym (ryciny 28 i 44). Według opisu metody izolacji mitochondriów zostały one ostatecznie umieszczone w następującym roztworze: 10 mM HEPES, 250 mM sacharoza, 1 mM ATP, 80 μ M ADP, 5 mM bursztynian sodu, 2 mM K_2HPO_4 , 1 mM DTT; pH 7,5. Moją uwagę zwrócił brak $MgCl_2$ i EGTA w tym roztworze. Metodą luminescencyjną z zastosowaniem lucyferazy oznaczano poziom ATP w próbkach mitochondriów zawieszonych w takim właśnie roztworze. Nie jest dla mnie jasne, co głównie wpływało na poziom mierzonego ATP. Czy była to szybkość syntezy ATP w oksydacyjnej fosforylacji czy też aktywność obecnych w preparacie ATPaz? W każdym preparacie są przecież rozbite mitochondria. Na to pytanie mogłyby odpowiedzieć wyniki kontroli z użyciem oligomycyny.

Podsumowując. Magister Aleksandra Zawadzka przedstawiła ambitną i wielowątkową rozprawę doktorską. Przedstawiła ona wiele obiecujących wyników. Są one dobrym otwarciem do fascynującego i nowego kierunku badań. Ta tematyka powinna być kontynuowana w pracowni, najlepiej we współpracy z innymi grupami badawczymi specjalizującymi się w fizjologii mitochondriów. Doktorantka wykazała się dużą sprawnością warsztatową i erudycją naukową. Ciekawie opisała swoje badania, łącząc sprawnie i logicznie wiele ich wątków. Moje krytyczne uwagi przedstawiłem z szacunku dla jej talentu. Nie zmieniają one jednak mojej ogólnie dobrej opinii o tej rozprawie.

W mojej opinii przedstawiona do recenzji praca spełnia wszystkie warunki stawiane rozprawom doktorskim określone w artykule 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym. Wnoszę więc do Rady Naukowej Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. Mirosława Mossakowskiego Polskiej Akademii Nauk o dopuszczenie pani mgr Aleksandry Zawadzkiej do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Janusz Dąbrowski', is centered on the page.