



UNIWERSYTET
MIKOŁAJA KOPERNIKA
W TORUNIU

Wydział Nauk Biologicznych
i Weterynaryjnych

Prof. dr hab. Justyna Rogalska,
Katedra Fizjologii Zwierząt i Neurobiologii
Wydział Nauk Biologicznych i Weterynaryjnych
Uniwersytet Mikołaja Kopernika
ul. Lwowska 1
87-100 Toruń
e-mail: rogal@umk.pl

O C E N A

rozprawy doktorskiej Pani magister Justyny Janowskiej pt.
**„ROLA ZMIAN W FUNKCJONOWANIU OLIGODENDROCYTÓW W PATOGENEZIE
ZABURZEŃ ISTOTY BIAŁEJ BĘDĄCYCH SKUTKIEM ASFIKSJI NEONATALNEJ”**

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska poświęcona została badaniu zaburzeń procesu mielinizacji po asfiksji neonatalnej. Z uwagi na kluczową rolę tego procesu dla prawidłowej funkcji układu nerwowego doktorantka podjęła się również opracowania nowej metody hodowli komórek progenitorowych oligodendrocytów, co ma kluczowe znaczenie dla poszukiwania nowych miejsc uchwytu dla leków niwelujących uszkodzenia hipoksyjno-ischemiczne na wczesnym etapie rozwoju mózgowia. Ważną strategią obrony przed rozwojem uszkodzeń mózgu jest wzmacnianie naturalnych endogennych mechanizmów neuroprotekcyjnych. To kolejny aspekt badań doktorantki: zastosowanie suplementacji insulinopodobnym czynnikiem wzrostu-1 (IGF-1) jako potencjalnego czynnika terapeutycznego, promującego dojrzewanie oligodendrocytów po epizodzie hipoksji-ischemii neonatalnej.

Wartość dysertacji podnosi fakt, iż badania zostały wykonane w ramach projektów badawczych finansowanych przez NCN, kierownikiem jednego z nich była promotor dysertacji dr hab. Joanna Sypecka, a drugiego promotor pomocniczy dr hab. Małgorzata Nałęcz. Pani mgr Justyna Janowska była z kolei beneficjentem stypendium Etiuda, również finansowanego przez NCN. Ponadto należy podkreślić, że część przedstawionych w dysertacji wyników została już opublikowana w 3 oryginalnych pracach, które ukazały się w impaktowanych czasopiśmie: Journal of Cellular and Molecular Medicine, International Journal of Molecular Sciences and Molecular Neurobiology. Pani mgr Janowska jest pierwszym autorem w dwóch pracach, a w trzeciej drugim autorem. A zatem, zarówno sama tematyka badań, jak też część wyników dysertacji zostały pozytywnie ocenione przez recenzentów tych publikacji.

Konsekwencje niedotlenienia okołoporodowego są zróżnicowane, złożone i często trudne do przewidzenia. Uszkodzenia mózgu na skutek jego niedotlenienia/niedokrwienia mają charakter progresywny. To powoduje, że zaburzenia funkcjonowania mózgu mogą pojawić się w czasie odległym od epizodu niedotlenienia w postaci różnego typu zaburzeń funkcji mózgowia w zależności od rozległości i lokalizacji uszkodzeń, a nawet w dorosłym życiu, jako różnego typu choroby neurodegeneracyjne. Z tego powodu od wielu lat poszukuje się skutecznych metod terapeutycznych, zapobiegających lub zmniejszających uszkodzenia mózgu indukowane niedotlenieniem okołoporodowym. Badania opisane w dysertacji wpisują się w ten nurt badawczy. Mgr Janowska swoją uwagę skupiła na uszkodzeniach istoty białej,

ze względu na ich potwierdzoną rolę w rozwoju zaburzeń neurobehawioralnych obserwowanych u dzieci, które przeżyły asfiksję okołoporodową.

Układ pracy jest typowy dla prac doświadczalnych. Rozprawa zawiera 126 stron podzielonych na 7 rozdziałów: 1. Wstęp, 2. Założenia i cele pracy, 3. Materiały i Metody, 4. Wyniki, 5. Dyskusja, 6. Wnioski i podsumowanie, 7. Bibliografia. Każdy z rozdziałów uzupełniony jest szczegółowymi podrozdziałami. Praca zawiera także streszczenie: po polsku i angielsku, oraz alfabetyczny wykaz stosowanych skrótów. Cytowana literatura jest bogata liczbowo (209 pozycji!), co dowodzi dogłębnej analizy badanego tematu przez doktorantkę. Na szczególne podkreślenie zasługuje estetyka przygotowania rozprawy: przejrzysty, poprawny język naukowy, schematy o dużej wartości informacyjnej, czytelne, dobrze opisane ryciny.

Rozprawa zawiera streszczenie w języku polskim i angielskim. Tutaj mam uwagę, że brakuje konkluzji/ podsumowania badań i ich znaczenia. Streszczenie powinno dawać ogólny, ale jednak pełen obraz zrealizowanych badań.

We wstępie rozprawy doktorantka bardzo czytelnie i jasno przedstawia problem badawczy, zwracając szczególną uwagę na te elementy, które stały się podstawą do sformułowania celów pracy. Autorka przedstawia charakterystykę encefalopatii hipoksyjno-ischemicznej, ze szczególnym uwzględnieniem zaburzeń rozwoju istoty białej. Ponadto przedstawia terapie o potencjalnym działaniu mielinoprotekcyjnym. W ostatnim podrozdziale wstępu znalazł się opis dotychczasowych wyników badań dotyczących zastosowania IGF-1 w terapii encefalopatii hipoksyjno-ischemicznej.

Wstęp w logiczny sposób prowadzi do kolejnej części rozprawy, czyli założeń i celów podjętych przez doktorantkę badań. Szczegółowe cele dysertacji, autorka zamknęła w 4 kolejnych, dobrze przemyślanych i logicznie zaplanowanych etapach. Pierwszy, który implikuje kolejne to opracowanie metody izolacji i hodowli szczurzych OPCs, w warunkach normoksji fizjologicznej i pożywce bezsurowiczej. Następny etap to ocena proliferacji OPCs oraz dojrzewania oligodendrocytów w modelach asfiksji neonatalnej *in vivo*, *ex vivo* i *in vitro*. Kolejny - ocena zmian stężenia IGF-1 w tkance nerwowej po hipoksyjno-ischemicznym uszkodzeniu. Ostatni etap badań miał na celu sprawdzenie potencjalnego udziału IGF-1 we wspomaganium oligodendrogenезы i/lub mielinizacji.

W części rozprawy „Założenia i cele” autorka sformułowała również generalną hipotezę badawczą, którą weryfikowała w swoich badaniach postulującą, że pod wpływem hipoksji – ischemii progenitory oligodendrocytów mają zaburzony program wzrostu i różnicowania, który promuje utrzymanie ich w stanie progenitorowym i ogranicza dojrzewanie, co prowadzi do nieprawidłowej mielinizacji. Biorąc pod uwagę jak duży udział mają w dysertacji badania dotyczące optymalizacji warunków hodowli OPCs, brakuje w tej części pracy hipotez związanych z tym aspektem. Taka hipotezę znajdujemy dopiero w dyskusji (str. 98) cytując „Zaproponowana w tej pracy hipoteza badawcza, postulująca zmniejszony potencjał do różnicowania oligodendrocytów hodowanych w normoksji fizjologicznej w porównaniu do standardowych warunków tlenowych itd. A zatem hipotezy są, natomiast zabrakło pewnej konsekwencji w ich umieszczeniu w dysertacji.

Metodyka przeprowadzonych badań jest imponująca, przede wszystkim w zakresie różnorodności zastosowanych metod i technik. Były to badania prowadzone zarówno *in vitro*, *ex vivo* i *in vivo*. W badaniach *in vitro* wykorzystano hodowle pierwotne szczurzych neonatalnych OPCs natomiast w badaniach *ex vivo* hodowle organotypowych skrawków hipokampa, poddanych czasowemu ograniczeniu dostępu do składników odżywczych i tlenu (OGD, ang. oxygen-glucose deprivation). Te metody mają szereg zalet, ale również ograniczenia stąd zastosowanie badań *in vivo* pozwoliło na zweryfikowanie oraz uzupełnienie wiedzy pozyskanej z badań prowadzonych w warunkach pozaustrojowych. Model asfiksji neonatalnej *in vivo* został wywołany u 7-dniowych szczurów stada Wistar, jest to zweryfikowana procedura, która najpełniej odzwierciedla charakterystykę zamartwicy u noworodków ludzkich. Tutaj warto wspomnieć, że szczególnie wrażliwe na niedotlenienie są wcześniaki. Rozwój mózgowia u 7-dniowych szczurów jest adekwatny do rozwoju mózgowia u wcześniaków ludzkich, stąd taki model został użyty w badaniach mgr Janowskiej. Autorka zweryfikowała również dane literaturowe dotyczące etapów mielinizacji w mózgu noworodka

szczurzego i ludzkiego. Mielinizacja rozpoczyna się odpowiednio w P7 u szczura oraz między 30 a 36 tygodniem ciąży u człowieka, kiedy pojawiają się pierwsze oligodendrocyty wytwarzające białka budulcowe błony mielinowej. Co istotne, ta frakcja komórek oligodendrocytarnych to najliczniejsza grupa komórek zasiedlających rozwijający się OUN i jednocześnie najbardziej wrażliwa na czynniki mogące indukować nekrozę, czy apoptozę czyli również hipoksję/ischemię. A zatem wybór wieku zwierząt, które zostały poddane niedotlenieniu/niedokrwieniu jest jak najbardziej odpowiedni w kontekście postawionych w pracy celów badawczych.

Rozdział metodyka jest bardzo złożony, jest to konsekwencja wspomnianej wcześniej różnorodności zastosowanych metod. Jednak rozdział ten staje się w pełni jasny dopiero po przeczytaniu dyskusji, gdzie wyjaśniono przyczyny doboru metod czy przyjęte rozwiązania z uzasadnieniem. Rozumiem przesłanki do opisu zastosowanych metod i technik w rozdziale metody zgodnie z przyjętymi zasadami układu rozdziałów w pracy eksperymentalnej, ale w przypadku tej dysertacji metody i techniki nie były jedynie narzędziem do uzyskania wyników, ale modyfikacja/optimalizacja tych metod była również jednym z głównych celów przeprowadzonych badań, stąd uwzględnienie tej specyfiki badań w konstrukcji pracy byłoby zasadne i umożliwiło lepsze zrozumienie zastosowanych procedur.

Do tej części pracy mam pytanie. Prosiłabym o wyjaśnienie wyboru wartości temperatury 35°C w komorze podczas ekspozycji noworodków szczura na hipoksję. Domyślam się, że wartość ta została dobrze przemyślana w kontekście specyfiki procesów termoregulacyjnych u noworodków szczura, jednak chciałabym poznać te argumenty.

Autorka wyniki swojej pracy przedstawia bardzo jasno, konsekwentnie do podjętych zadań badawczych. Ich wizualizacja w postaci wykresów, tabel i zdjęć mikroskopowych dodatkowo sprawiają, że są one bardzo czytelne.

Dobrze przemyślane, logicznie zaplanowane badania, a także ich konsekwentna i precyzyjna realizacja, przyniosły spodziewane efekty. W pierwszym etapie badań, doktorantka podjęła się trudnego i pracochłonnego zadania - opracowania optymalnych warunków hodowli pierwotnych OPCs. Ponadto doktorantka opracowała zastosowanie procedury OGD w hodowlach *in vitro* OPCs oraz organotypowych skrawków hipokampa (*ex vivo*).

Na szczególne podkreślenie zasługuje zastosowanie właściwych dla komórek warunków tlenowych, czyli 5% udział tlenu w mieszaninie gazów w atmosferze inkubatora, w którym hodowane są komórki, a nie jak dotychczas standardowo stosowanego stężenia, czyli 21% O₂. A zatem procedura uwzględniała rzeczywistą normoksję fizjologiczną, która jest definiowana w zakresie ciśnienia parcjalnego tlenu 2-12 kPa (co odpowiada około 2-12% O₂ w tkance), przy czym najniższe stężenie wykrywane jest m.in. w mózgu. W przeprowadzonych eksperymentach udowodniono, że rzeczywiście taka procedura sprzyja utrzymaniu w hodowli dużego odsetka OPCs i zapobiega przedwczesnemu starzeniu się hodowli. Jest to niezwykle ważne aby w modelach badawczych odwzorowywać jak najdokładniej warunki fizjologiczne, czy też patologiczne w przypadku modelowania zaburzeń, panujące w organizmie ludzkim. Jest to jeden z kluczowych czynników, gwarantujących uzyskanie wyników, które mogą być wykorzystywane do planowania strategii terapeutycznych u człowieka. Stąd ten aspekt pracy, czyli uwzględnienie w warunkach hodowli stężenia tlenu typowego dla komórek w organizmie uważam za najbardziej cenny. Zdecydowanie procedura ta będzie mogła znaleźć zastosowanie w testowaniu substancji o potencjalnym działaniu promującym dojrzewanie oligodendrocytów i mielinizację w patologii niedokrwienia/niedotlenienia okołoporodowego.

W dyskusji znajdujemy wyjaśnienie niekorzystnego wpływu hiperoksji na żywotność komórek w hodowli. Ciekawa jestem opinii doktorantki na temat udziału czynnika indukowanego hipoksją HIF-1 w tym procesie, gdyż jak wiadomo jego ekspresja jest regulowana poziomem tlenu.

W kolejnym cyklu badań doktorantka wykazała, że wrażliwość komórek progenitorowych oligodendrocytów na deficyt glukozy i tlenu jest mniejsza niż w przypadku neuronów, ale jednak nie pozostaje bez wpływu na różnicowanie tych komórek. Zaobserwowano również zróżnicowanie wpływu HI na proliferację oligodendrocytów w zależności od rejonu mózgowia. W rejonach, w których fizjologicznie odbywa się intensywne różnicowanie i mielinizacja, mimo iż HI stymuluje proliferację OPCs w tkance nerwowej i nie zaburza syntezy białek mielinowych,

to nie są one zdolne do funkcjonalnej mielinizacji aksonów. Natomiast w niszach neurogennych HI hamuje proliferację OPCs, co może mieć niekorzystny wpływ na rozwój OUN w dalszych etapach rozwoju. U szczurów również zaobserwowano zwiększoną syntezę białek mieliny po HI. Jednak, po 10 dniach od HI stwierdzono istotne zmiany w strukturze mieliny i typowy obraz kliniczny hipoksji-ischemii neonatalnej, tj. hipotrofię hipokampa, spoidła wielkiego i prążkowiec oraz obszary wyraźnej hipomielinizacji w rejonie kory, prążkowiec i CA3 hipokampa. Autorka stwierdza, że przyczyną tego zjawiska może być zwiększony poziom czynników troficznych obserwowany po wystąpieniu hipoksji-ischemii, które mogą nasilać proliferację OPCs, ale działać hamująco na dojrzewanie oligodendrocytów. Zabrakło mi w dyskusji bardziej szczegółowej analizy tego mechanizmu. Jest to istotne w kontekście wyboru momentu podania leków wspierających dojrzewanie oligodendrocytów, co Autorka sama słusznie zauważyła.

W ostatnim etapie badań, autorka potwierdziła, że HI ma istotny wpływ na stężenie IGF-1, co z kolei może determinować proliferację i różnicowanie OPCs, w ślad za tym postanowiła zweryfikować wpływ suplementacji IGF-1 na zmiany proliferacji komórek. Wykazano, że efekt działania suplementacji IGF-1 w tkance nerwowej po uszkodzeniu HI jest dawkozależny: w niskim stężeniu przyczynia się do promowania dojrzewania komórek, zaś w wysokim stężeniu – do proliferacji OPCs. Zastosowanie suplementacji w wysokim stężeniu sprzyjało wytwarzaniu wypustek komórkowych, co może oznaczać również wpływ na promowanie dojrzewania tych komórek. Wyniki tych doświadczeń pozwalają przypuszczać, że IGF-1 jest jednym z czynników, które mogą modulować proliferację, dojrzewanie oligodendrocytów i ich zdolność do mielinizacji w HIE, a zatem szlaki sygnalizacyjne z udziałem IGF-1 mogą stać się celem nowych terapii po asfiksji okołoporodowej, ale także w przypadku innych chorób, w których stwierdza się zaburzenia mielinizacji.

Dyskusja świadczy o dużej wnikliwości doktorantki. Pani mgr Janowska dowiodła, że doskonale porusza się w zagadnieniach związanych z tematem dysertacji i w tej części pracy elegancko argumentuje w jaki sposób jej badania wpisują się w opracowanie metod, które mogą posłużyć do identyfikacji nowych leków niwelujących uszkodzenia hipoksyjno-ischemiczne. Podsumowaniem pracy mgr Janowskiej jest 7 jasno przedstawionych wniosków, uzasadnionych uzyskanymi wynikami, które potwierdzają zrealizowanie postawionych celów badawczych.

Jak wspomniałam wcześniej wyniki zamieszczone w rozprawie zostały opublikowane w postaci 3 prac oryginalnych w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym. To czego brakuje w dysertacji to wyraźnego odnoszenia się w teście do tych konkretnych prac, wskazanie, które z wyników zostały już opublikowane. Dwie prace znajdują się w spisie publikacji pod numerem 160 i 198, a zatem nie zostały w żaden sposób wyróżnione, natomiast praca Ziemka-Nałęcz i wsp. 2018 roku w ogóle nie jest cytowana w teście. W związku z tym, że nie wszystkie wyniki zostały opublikowane wskazanie ich logicznego związku w postaci dysertacji było jak najbardziej uzasadnione. Sądzę jednak, że publikacje to coś czym zdecydowanie trzeba się chwalić.

Czytając pracę znalazłam kilka literówek czy skrótów myślowych, na które z obowiązku recenzenta muszę zwrócić uwagę. Przytoczę kilka przykładów:

- w spisie skrótów brakuje: OPCs (komórki progenitorowe oligodendrocytów), który najczęściej pojawia się w dysertacji

str. 21 „zmiany w obszarze jądra podstawy” – powinno być jąder podstawy, ponieważ zdanie dotyczy ogólnie struktur dotkniętych uszkodzeniem, a jądra podstawy są parzyste.

str. 35 – napisano: „komórki utrzymywano w pożywce bezsurowiczej w warunkach normoksji fizjologicznej (37°C, 21% O₂, 5% CO₂) i podano stężenie tlenu 21% zamiast 5%

str. 96 – napisano „co może potwierdzać hipotezę o spowolnieniu procesu starzenia hodowli w niskim tlenu” – skrót myślowy

To są drobne uchybienia, które nie wpływają na moją bardzo wysoką ocenę części merytorycznej dysertacji.

W podsumowaniu chciałabym wyraźnie podkreślić, że mgr Justyna Janowska wynikami swojej pracy zrealizowała zamierzone cele. Było to możliwe dzięki dobrze zaplanowanym badaniom, a także ich konsekwentnej realizacji z użyciem różnorodnych

technik i metod badawczych. Przedstawione wyniki w istotny sposób uzupełniają istniejącą wiedzę wnosząc zupełnie nowe elementy w zrozumienie mechanizmu rozwoju uszkodzeń indukowanych niedotlenieniem/niedokrwieniem mózgowia. Ponadto rozprawa pozwala stwierdzić, że doktorantka posiada ogólną wiedzę teoretyczną w dyscyplinie biologia medyczna i umiejętności samodzielnego prowadzenia pracy badawczej.

Konkludując, uważam, że rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 13 ust. z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 z późn. zm.) i zwracam się do Rady Naukowej Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego PAN w Warszawie o nadanie Pani mgr Justynie Janowskiej stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych, w dyscyplinie biologia medyczna a także ze względu na bardzo wysoką jakość przedstawionych badań i ich znaczenie aplikacyjne wnioskuję o wyróżnienie rozprawy.

Prof. dr hab. Justyna Rogalska

Toruń, dnia 28. luty 2022