

Warszawa, 11.09.2023

Marta B Wiśniewska  
Laboratorium Neurobiologii Molekularnej  
Centrum Nowych Technologii UW  
E.mail: [m.wisniewska@cent.uw.edu.pl](mailto:m.wisniewska@cent.uw.edu.pl)

### **RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ PANI ANITY LEWCZUK**

Przedstawiona mi do recenzji praca doktorska Pani Anity Lewczuk została wykonana w Instytucie Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. Mirosława Mossakowskiego w Warszawie pod kierunkiem prof. Barbary Zabłockiej i dr Małgorzaty Beręsewicz-Haller. Wyniki zaprezentowane w rozprawie zostały już opublikowane w dwóch artykułach oryginalnych, w których doktorantka jest pierwszą autorką.

Badania projektu doktorskiego dotyczyły udziału czynnika transkrypcyjnego NRF2 w mechanizmach naturalnej neuroprotekcji w udarze niedokrwienno-reperfuzyjnym w podregionach hipokampa. Wybór tematu został przekonująco uzasadniony. Czynniki NRF2 jest znanym, powszechnie występującym regulatorem genów zaangażowanych w procesy antyoksydacji, detoksykacji i przeciwzapalne w różnych komórkach organizmu. W mózgu, gdzie występuje zarówno w neuronach, jak i komórkach gwałtownych, chroni przed neurodegeneracją i skutkami udaru, dlatego farmakologiczna modyfikacja jego aktywności jest brana pod uwagę jako obiecujący element terapii w stanach patologicznych. Cele pracy zostały jasno postawione. Było to po pierwsze wykazanie, że aktywacja NRF2 jest elementem naturalnej neuroprotekcji w hipokampie, a po drugie identyfikacja genów docelowych dla NRF2 aktywowanych w hipokampie w odpowiedzi na stres niedokrwienno-reperfuzyjny (I/R).

W pierwszej części pracy porównano aktywność NRF2 w podregionach hipokampa odpornych (CA2-3/DG) i wrażliwych (pole CA1) na stres oraz zbadano pełną dynamikę odpowiedzi obejmującą okres od kilku minut do kilku dni po wywołaniu przejściowego niedokrwienia. Uzyskane wyniki są bardzo wartościowe, jeżeli chodzi o aspekt poznawczy. Doktorantka zaobserwowała m. In., że poziom czynnika NRF2 we frakcji jądrowej jest naturalnie wyższy w rejonach hipokampa odpornych na stres I/R, zgodnie z postawioną hipotezą, i dodatkowo rośnie kilka dni po zadziałaniu stresu. Szczególnie

cenne było funkcjonalne udowodnienie, że regionom wrażliwym na stres można nadać odporność farmakologicznie aktywując czynnik NRF2 sulforafanem, podawanym równolegle do bodźca stresowego lub do 30 minut po zadziałaniu stresu. Wartość tych wyników podnosi dodatkowo zastosowanie dwóch modeli badawczych: uszkodzenia ekscytotoksycznego w hodowlach organotypowych hipokampa izolowanego ze szczurzych osesków oraz krótkotrwałego niedokrwienia mózgu u suwaka mongolskiego. W Dyskusji Autorka zwróciła uwagę, że „prezentowane wyniki wskazują na możliwość (...) uzyskania efektu ochronnego nawet po zadziałaniu bodźca I/R. Jest to niezwykle ważne w kontekście pacjentów po epizodach niedokrwienych (...) do których pomoc zwykle dociera po kilku godzinach od wystąpienia pierwszych objawów”. Ponieważ jest to faktycznie ważny aspekt badań, ciekawa jestem, jak Autorka interpretuje fakt, że w hodowlach organotypowych przy opóźnieniu podania sulforafanu większym niż 30 minut nie występuje już efekt neuroprotekcyny, podczas gdy naturalna aktywacja NRF2 w modelu in vivo następuje dopiero dwa dni po udarze. Czy możliwe jest, że dynamika aktywacji NRF2 w hodowlach organotypowych jest inna niż in vivo po stresie I/R? Czy w przypadku modelu in vivo nie byłoby warto podjąć próbę ochrony neuronów podając sulforafan z większym opóźnieniem?

W drugiej części pracy doktorantka weryfikowała zależność od NRF2 ekspresji kilkunastu wytypowanych genów w hipokampie w odpowiedzi na stres I/R. Wytypowane geny są potencjalnie interesujące z punktu widzenia rozwoju terapii neuroprotekcyny, jednak nie zostałam przekonana, że są to faktycznie geny docelowe dla NRF2. Po pierwsze poziom ekspresji większości z nich był wyższy w części hipokampa z niską aktywnością NRF2, po drugie kierunek i dynamika zmian poziomu ekspresji po wywołaniu niedokrwienia naogół nie zgadzała się z dynamiką zmian poziomu NRF2: ekspresja *Stc2* była podwyższona w punkcie 24 h a ekspresja *Aifm2*, i *Camk1* i *Gpc1* w punkcie 96 h, podczas gdy wzrost NRF2 następował w 48 h; ekspresja 10 genów nie zmieniła się lub została zahamowana; jedynie zmiany ekspresji *Brip1* i *Tdo2* podążały za zmianami NRF2. Ponadto nie mogę się zgodzić, że samo wystąpienie korelacji „pozwała na zakwalifikowanie wymienionych genów (...) do ścieżek indukowanych przez NRF2 w odpowiedzi na stres” (punkt 7 Podsumowania), i nie mogę się zgodzić, że przy braku wzrostu poziomu mRNA wzrost poziomu białka (przypadek genu *Fzd7*) pozwala na uznanie genu za indukowany przez NRF2 (str.85). Uważam więc wnioski, że „mechanizm neuroprotekcyny działania NRF2 opiera się o aktywację dużej grupy genów...” i że wyniki te „pozwoły na wyłonienie i poszerzenie wiedzy na temat udziału genów regulowanych przez NRF2 w naturalnych mechanizmach obronnych mózgu” za zdecydowanie zbyt mocno sformułowane.

Jeżeli chodzi o samą rozprawę, ma ona formę tradycyjną i opatrzona jest obszerną bibliografią (267 pozycji). Napisana jest jasnym i dobrym językiem, ma logiczną i jasną strukturę.

Wstęp jest dosyć krótki (10 stron), co samo w sobie nie jest wadą, a może nawet jest zaletą, bo nie został przeładowany nieistotnymi szczegółami. Zakres merytoryczny Wstępu został dobrze

dobrany, jednak w mojej ocenie zabrakło pogłębienia niektórych aspektów. Na przykład w rozdziałach „Procesy komórkowe aktywowane w wyniku niedokrwienia i reperfuzji” i „Endogenna neuroprotekcja” Autorka ignoruje fakt, że w mózgu poza neuronami występują różnego rodzaju komórki, i szczególnie astrocyty mają duży udział w neuroprotekcji. Ta kwestia jest istotna dla interpretacji wyników, ponieważ czynnik NRF2 jest aktywny nie tylko w neuronach a sulforafan podany dootrzewnowo działa też na inne komórki. To co mi się natomiast podobało, to identyfikacja w każdym rozdziale obszarów niewystarczająco jeszcze zbadanych.

W sporo dłuższej Dyskusji (20 stron) Autorka swobodnie wyjaśniła interpretację i znaczenie wyników na tle dotychczasowej wiedzy. Uważam, że niepotrzebnie aż 30% tekstu poświęciła szczegółowemu omówieniu zidentyfikowanych potencjalnych neuroprotektynowych genów docelowych dla NRF2 w hipokampie, ponieważ na tym etapie badań, jak wspomniałam wyżej, ich udział w neuroprotekcji zależnej od NRF2 jest niepewny.

Mam kilka uwag do opisu metod i prezentacji wyników na rycinach. Z protokołów w Materiałach i Metodach nie zrozumiałam, w jaki sposób mierzono immunoreaktywność oraz jak obliczano względną ekspresję genów (informacja, że do obliczeń użyto cyklu granicznego nie jest wystarczająca). Osie Y na wykresach zostały opisane nieprecyzyjnie: „NRF2 % CA1”, „NRF2 % THOC” itd. (ryc. 7-9); „fluorescencja jodku propidyny %” (ryc. 10 – w opisie pod figurą jest mowa o liczbie pikseli a nie %); „średni wzrost ekspresji” (ryc. 13 – tu chyba nie chodzi o wzrost tylko o poziom); „poziom ekspresji mRNA” (ryc. 17, 18, 19, 20, 21, 22 – co oznaczają wartości na osi Y?), „poziom immunoreaktywności” (ryc. 18-22 – co to za jednostki?); a na ryc. 15 i 16 osie Y w ogóle nie zostały opisane. Pozytywnie natomiast oceniam dokładność w opisanii odczynników użytych do badań (numery katalogowe), przeciwciał (numery katalogowe i zastosowane rozcieńczenia) oraz starterów (numery dostępu dla genów, sekwencje i wielkości produktów). Chcę jednak na koniec podkreślić, że powyższe niedociągnięcia nie zmieniają mojej wysokiej oceny metodyki pracy. Szczególnie doceniam wysiłek włożony w dobranie genów referencyjnych do analiz qRT-PCR, gdzie zanalizowano stabilność ekspresji aż 7 potencjalnych genów referencyjnych w badanych regionach hipokampa.

Podsumowując, przeprowadzone badania należą do jednego z ważniejszych obecnie nurtów w neurobiologii poznawczej i aplikacyjnej, mianowicie badań nad naturalną neuroprotekcją i możliwością wykorzystania naturalnych mechanizmów w prewencji i leczeniu skutków udarów. Jestem przekonana, że praca Pani Anity Lewczuk pogłębiła wiedzę na ten temat. Stwierdzam, że przedstawiona do recenzji rozprawa spełnia ustawowe warunki stawiane pracom doktorskim i stawiam wniosek do Rady Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. Mirosława Mossakowskiego w Warszawie o dopuszczenie Pani Anity Lewczuk do dalszych etapów przewodu doktorskiego.