

dr hab. Małgorzata Zawadzka, prof. instytutu
Pracownia Plastyczności Nerwowo-Mięśniowej
Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego
Polska Akademia Nauk
ul. Pasteura 3
02-093 Warszawa

Warszawa, 18.09.2023 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej lek. wet. Anity Lewczuk

pt. „Zróżnicowana wrażliwość mózgu suwaka mongolskiego na uszkodzenie niedokrwienno-reperfuzyjne. Udział czynnika transkrypcyjnego NRF2 w endogennej neuroprotekcji” wykonanej w Pracowni Biologii Molekularnej Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. Mirosława Mossakowskiego PAN pod kierunkiem prof. dr hab. Barbary Zabłockiej i promotora pomocniczego dr Małgorzaty Beręsewicz-Haller.

1. ZASADNOŚĆ PODJĘCIA TEMATU PRACY DOKTORSKIEJ

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska wpisuje się w nurt badań podstawowych, nakierowanych na zrozumienie mechanizmów endogennej neuroprotekcji wobec uszkodzenia mózgu spowodowanego skutkami niedokrwienia i reperfuzyi. Zagadnienie to jest niezwykle aktualne w związku ze wzrostem średniej długości życia i procesami starzenia się współczesnych społeczeństw. Udar mózgu jako druga, po chorobie niedokrwiennej serca, przyczyna śmierci na świecie stanowi istotny problem dla współczesnej medycyny, i to nie tylko z powodu tak wysokiej śmiertelności, ale również dlatego, że jest jedną z najczęstszych przyczyn długotrwałej niepełnosprawności dorosłych. Ponadto, etiologia zawału mózgu jest złożona i wieloczynnikowa, a profilaktyka, podobnie jak w przypadku schorzeń układu krążenia, nieefektywna, co pogłębia trudności leczenia przyczynowego. Jediną skuteczną strategią leczenia jest więc jak najszybsze przywrócenie przepływu krwi, jednak długość okna terapeutycznego dla kilku dostępnych tego typu terapii wciąż pozostaje limitowana. Wydaje się więc, że przedmiotem intensywnych badań powinny stać się strategie terapeutyczne ukierunkowane na neuroprotekcję ponieważ, niezależnie od natury czynnika etiologicznego, dawałyby możliwość poprawy klinicznej.

Doktorantka skupiła swoją uwagę na zbadaniu roli czynnika transkrypcyjnego Nrf2 w mechanizmach endogennej neuroprotekcji wobec epizodu niedokrwienego, charakterystycznej dla niektórych rejonów hipokampa i podjęła próbę zrozumienia mechanizmów molekularnych tego zjawiska.

Badania zostały wykonane w ramach projektu badawczego finansowanego przez NCN, środków statutowych Instytutu jak również z grantu uzyskanego w ramach Programu Operacyjnego Wiedza Edukacja Rozwój 2014-2020, projektu współfinansowanego ze środków Europejskiego Funduszu Społecznego.

Tematyka i wyniki badań przedstawione w rozprawie zostały już pozytywnie ocenione przez recenzentów i opublikowane w formie dwóch prac oryginalnych w czasopismach *Molecular Neurobiology* i *International Journal of Molecular Sciences*. Doktorantka jest pierwszą autorką obu publikacji.

Biorąc pod uwagę wszystko powyższe, temat rozprawy doktorskiej uważam za zasadny, nie tylko z punktu widzenia badań podstawowych, ale także ze względu na znaczenie dla rozwoju nowych strategii neuroprotekcyjnych w leczeniu skutków niedokrwienia mózgu.

2. OCENA FORMALNA PRACY DOKTORSKIEJ

Praca skonstruowana jest w sposób typowy dla tego rodzaju opracowań i składa się z następujących części: wstęp, cele pracy, materiały i metody, wyniki, dyskusja, podsumowanie i wnioski, suplement i bibliografia (łącznie 109 stron). Praca zawiera także streszczenie w języku polskim i angielskim, rozdział definiujący innowacyjność rozprawy oraz alfabetyczny wykaz stosowanych skrótów. Cytowana literatura to 267 pozycji, co dowodzi dogłębnej znajomości badanego tematu. Wprowadzenie numeracji rozdziałów byłoby pomocne dla czytelnika.

3. OCENA MERYTORYCZNA PRACY DOKTORSKIEJ

Rozprawa rozpoczyna się od krótkiego rozdziału sygnalizującego innowacyjne aspekty podjętych badań. Jako najważniejsze z nich Doktorantka wymieniła: opisanie zwiększonej ekspresji białka Nrf2 w odpornym na skutki niedokrwienia rejonie hipokampa w normie i po uszkodzeniu niedokrwienym, ochronne działanie farmakologicznej aktywacji czynnika Nrf2 w rejonie hipokampa wrażliwym na uszkodzenie oraz zidentyfikowanie nowych genów, których ekspresja jest regulowana przez czynnik transkrypcyjny Nrf2, a których produkty białkowe mogą być zaangażowane w regulację odpowiedzi komórek na uszkodzenie niedokrwienne. Zgadzam się z opinią Autorki, że aspekty te są istotne i stanowią o oryginalności i innowacyjności prezentowanych badań.

Wstęp do rozprawy jest 10-cio stronicowym rozdziałem, który Autorka rozpoczyna od przedstawienia definicji udaru niedokrwienego, jego etiologii i omówienia dostępnych strategii

leczenia przyczynowego. We wstępie rozprawy doktorantka przedstawia problem badawczy, zwracając szczególną uwagę na te elementy, które stały się podstawą do sformułowania celów pracy. Autorka opisuje procesy komórkowe aktywowane w wyniku niedokrwienia i następującej po nim reperfuzy oraz omawia poznane dotychczas mechanizmy endogennej neuroprotekcji ze szczególnym uwzględnieniem tzw. hartowania niedokrwionego oraz zjawiska odporności neuronów regionu CA2-3 i zakrętu zębatego hipokampa obserwowanego m.in. w modelu badawczym 5-minutowego zamknięcia tętnic szyjnych wspólnych u suwaka mongolskiego. Przy zastosowaniu tego modelu Autorka uzyskała większość wyników prezentowanych w rozprawie. W tej części dowiadujemy się również jakie mechanizmy uważano dotąd za przyczynę selektywnej odporności pewnych grup komórek w formacji hipokampa oraz, co bardzo istotne, poznajemy przesłanki podjęcia badań nad rolą czynnika Nrf2. Przypomniane w tej części mechanizmy dotyczą głównie komórek neuronów. Chciałbym zapytać Autorkę czy znana jest rola komórek glijowych w kształtowaniu selektywnej odporności komórek hipokampa na niedokrwienie? W kolejnych częściach wstępu znajdziemy charakterystykę czynnika transkrypcyjnego Nrf2, jako jednego z głównych białek odpowiedzialnych w komórce za indukowanie pro-życiowych, ochronnych systemów odpowiedzi na bodźce stresowe. Opisano w tej części mechanizm działania czynnika transkrypcyjnego Nrf2 oraz regulacji genów przez ten czynnik aktywowanych, z rozróżnieniem aktywacji ekspresji genów podstawowych (w warunkach fizjologicznych) i aktywacji genów indukowanych, która jest wywołana ekspozycją na bodźce stresowe. Ta część rozprawy została napisana poprawnie i jest ilustrowana rycinami, które ułatwiają zrozumienie treści. Doktorantka przedstawiła tu przesłanki, skłaniające Ją do podjęcia tematyki badawczej, ze szczególnym uwzględnieniem możliwości farmakologicznego aktywowania szlaków regulowanych przez Nrf2. Autorka w interesujący sposób, w oparciu o analizę literatury naukowej, dokonuje wprowadzenia w zakres podejmowanych problemów badawczych.

Wstęp w logiczny sposób prowadzi czytelnika do kolejnej części rozprawy jaką jest sformułowanie celów badawczych postawionych sobie przez Doktorantkę. Rozdział „Cele pracy” zawiera opis celu głównego, jakim było zbadanie roli czynnika transkrypcyjnego Nrf2 i wskazanie nowych genów przez niego regulowanych, zaangażowanych w mechanizm endogennej neuroprotekcji regionu CA2-3 i zakrętu zębatego hipokampa. Szczegółowe cele dysertacji obrazują logicznie zaplanowane etapy realizacji badań: począwszy od oznaczenia poziomu białka Nrf2 w jądrach komórkowych oraz jego inhibitora, białka KEAP1, w cytoplazmie komórek hipokampa w warunkach kontrolnych oraz w przebiegu epizodu niedokrwienno-reperfuzyjnego. Następnym etapem jest potwierdzenie aktywności Nrf2 w komórkach poprzez ocenę poziomu produktów białkowych znanych genów przez niego regulowanych. Kolejnym etapem pracy było zbadanie wpływu farmakologicznej aktywacji Nrf2 na przeżywalność komórek wrażliwego na niedokrwienie rejonu hipokampa. Ostatni etap badań miał na celu

zidentyfikowanie, w analizie *in silico*, genów potencjalnie regulowanych przez czynnik transkrypcyjny Nrf2 oraz zweryfikowanie czy ich ekspresja ulega zmianom w wybranych regionach hipokampa suwaka mongolskiego w przebiegu uszkodzenia niedokrwienno-reperfuzyjnego. Problem badawczy został poprawnie rozpoznany i podjęcie badań jest w pełni uzasadnione, jednak nie znalazłam jasno sformułowanej hipotezy badawczej. Autorka nie ustrzegła się tutaj kilku błędów. Po pierwsze, w opisie pierwszego celu badawczego użyto sformułowania „zbadanie aktywności Nrf2 poprzez oznaczenie poziomu tego białka w jądrach komórkowych” podczas gdy badano rzeczywiście poziom białka a nie jego aktywność. Po drugie, wydaje się, że rozdzielenie na dwa oddzielne punkty 6 i 7 celu badawczego jakim było zweryfikowanie ekspresji genów wyselekcjonowanych w analizie *in silico* w normie oraz przebiegu epizodu niedokrwienno-reperfuzyjnego nie było konieczne.

Rozdział „Materiały i metody” rozpoczyna się spisem zastosowanych materiałów, pożywek do hodowli *in vitro*, roztworów i buforów, natomiast lista zastosowanych przeciwciał znalazła się w podrozdziale pt. „Detekcja z użyciem przeciwciał”, choć logiczne i bardziej użyteczne wydaje się zamieszczenie jej łącznie z innymi stosowanymi materiałami i odczynnikami. Opis stosowanych metod badawczych nie budzi istotnych wątpliwości, jednak znalazło się tutaj kilka niejasności:

1. Sformułowanie w opisie doświadczenia wykonanego w modelu *ex vivo* dotyczące sposobu analizowania obrazów mikroskopowych uzyskanych z obrazowania martwych komórek w skrawkach z organotypowej hodowli hipokampów szczura (str. 38) jest nieprecyzyjne. Zdanie: „uzyskane zdjęcia analizowano z wykorzystaniem niekomercyjnego programu komputerowego, który liczy świecące piksele na obrazie” nie precyzuje ani co poddano zliczaniu ani jak rzeczywiście tego dokonano. Te niejasności mają swoje skutki w trudności z interpretacją wyników tej części badań. Czy wspomniany program komputerowy został napisany przez Doktorantkę? Jeśli nie to należałoby podać jego źródło.

2. Nie jest zasadne rozdzielenie opisu wykonania procedury krótkotrwałego niedokrwienia mózgu u od opisu doświadczenia *in vitro*, które polegało na podawaniu dootrzewnowo roztworu sulforafanu, aktywatora czynnika transkrypcyjnego Nrf2 lub jego nośnika w przypadku zwierząt kontrolnych. W opisie doświadczenia w modelu *in vivo* brakuje dokładnej charakterystyki grup doświadczalnych i liczebności zwierząt w poszczególnych grupach.

3. Nie jest dla mnie jasna procedura izolacji RNA z hipokampów (str. 44), a szczególnie zasadność odważania części tkanki do analiz zamiast homogenizacji i pobierania potrzebnej ilości homogenatu.

Rozdział „Wyniki” jest 25-cio stronicową częścią pracy, zilustrowaną szesnastoma rycinami i jedną tabelą, podzieloną na podrozdziały odpowiadające zakresowi wykonanych badań. Pragnę zwrócić uwagę na kilka kwestii dotyczących tej części doktoratu:

1. Dotyczy prezentacji wyników analizy poziomu białek w różnych rejonach mózgu suwaka mongolskiego (ryciny 7 i 8). Pokazanie poziomu obu białek kontrolnych tj. białka macierzy jądrowej p84 (THOC1, markera frakcji jądrowych) oraz dehydrogenazy mleczanowej B (LDHB, markera frakcji cytoplazmatycznych) na rycinach 7 i 8 stanowiłoby dodatkową kontrolę czystości czy inaczej stopnia wzbogacenia uzyskanych frakcji, której nie zaprezentowano.

2. Jak już wspomniałam przy omawianiu rozdziału „Materiały i metody”, nie jest dla mnie jasny opis wyników uzyskanych z barwienia jodkiem propidyny skrawków hipokampa w hodowli organotypowej poddanych toksycznemu działaniu kwasu N-metylo-D-asparaginowego, NMDA, w obecności farmakologicznego aktywatora Nrf2, sulforafanu. Po pierwsze, jodek propidyny nie jest barwnikiem selektywnym dla neuronów i wiąże się do DNA wszystkich komórek z uszkodzoną błoną komórkową, dlatego nie można z całą pewnością twierdzić, że w doświadczeniu zliczono martwe neurony. Po drugie, obrazy mikroskopowe zamieszczone na rycinie 10 są nieczytelne, czarno-białe obrazy są bardzo słabo widoczne i trudne do interpretacji, nie są na nich zaznaczone rejony, które były analizowane ilościowo. Opis ryciny jest również nieprecyzyjny. W punkcie A opisu ryciny napisano: „NMDA powoduje rozległe uszkodzenie regionu CA1, które zmniejsza się po zastosowaniu 10 μ M SFN razem lub w 15 i 30-minutowym opóźnieniu w stosunku do NMDA”. Rozumiem, że do uszkodzenia w tym przypadku raczej nie dochodzi, czy też jest istotnie mniejsze, a nie „zmniejsza się” jak napisała Autorka. Opis wykresu zamieszczony w punkcie B „Wykres pudełkowy prezentuje liczbę pikseli poszczególnych skrawków w stosunku do maksymalnego uszkodzenia 100 μ M NMDA” jest dla mnie niezrozumiały.

3. Podobnie jak poprzednio, w przypadku analizy morfometrycznej komórek rejonu CA1 zwierząt poddanych niedokrwieniu (rycina 11 i 12) – barwienie hematoksyliną i eozyną nie pozwala na identyfikację neuronów. Jak analizowano morfologię neuronów pomimo braku specyficznego barwienia?

W tym punkcie nie umieszczono wyników dla grupy kontrolnej, której podano SFN. Wiemy tylko z tekstu, że SFN nie powodował zmian morfologii neuronów – ten wynik należało zaprezentować.

W opisie ryciny 12 w punkcie C,D napisano: „Zwiększona liczba prawidłowych neuronów (strzałka) w regionie CA1 po podaniu 5 mg/kg m.c. sulforafanu...” co zapewne należy rozumieć jako większa, niż w przypadku uszkodzenia kontrolnego, liczba prawidłowych neuronów, większa liczba zachowanych komórek.

4. Rycina 14, przedstawiająca „mapę termiczną” ekspresji genów regulowanych przez czynnik Nrf2 jest nieczytelna, nazwy genów i regionów ich ekspresji są niemożliwe do odczytania z ryciny. Ponieważ analiza nie wymagała klasteryzacji danych można było tutaj przedstawić dane w formie kilku równorzędnych map o lepszej rozdzielczości.

Na uwagę zasługuje dokonanie przez Doktorantkę walidacji ekspresji genów referencyjnych jako etapu poprzedzającego weryfikację uzyskanych w analizie *in silico* danych w modelu *in vivo*. Świadczy to o dużej rozwadze i rzetelności naukowej Badaczki.

Dyskusja jest tradycyjnie końcowym, przed wnioskami, rozdziałem rozprawy doktorskiej. Jest to dość obszerne opracowanie i wydaje mi się, że podzielenie wywodu na podrozdziały dotyczące interpretacji kluczowych wyników ułatwiłoby podążanie za tokiem rozumowania Autorki. W pierwszej części tego rozdziału Autorka prezentuje dotychczasowe doniesienia na temat udziału czynnika transkrypcyjnego Nrf2 w mechanizmach chroniących komórki przed uszkodzeniem w różnych modelach doświadczalnych udaru mózgu. Następnie Doktorantka przedstawia najważniejsze wyniki, uprawniające do zaproponowania szlaków regulowanych aktywnością Nrf2 jako istotnych dla endogennej neuroprotekcji. Autorka w ciekawy sposób dyskutuje uzyskane w analizie przeprowadzonej *in silico* dane, ich weryfikację przy pomocy metody RT-PCR oraz potencjalne znaczenie kilku wybranych genów w oparciu o dane literaturowe. Ta część napisana jest w bardzo jasny i ciekawy sposób i świadczy o dużej dojrzałości naukowej Autorki.

Nie znalazłam jednak w dyskusji uzasadnienia wyboru modelu czasowego zamknięcia tętnic szyjnych u suwaka mongolskiego do przeprowadzenia badań. Czy Doktorantka może uzasadnić swój wybór? W świetle literatury, wydaje się, że model doświadczalny jakim jest czasowe, odwracalne zamknięcie tętnicy środkowej mózgu jest obecnie „złotym standardem” doświadczalnym w badaniach dotyczących niedokrwienia mózgu. Ciekawa jestem czy Doktorantka planuje sprawdzenie, lub może już sprawdziła, czy zidentyfikowane geny, indukowane przez aktywność Nrf2, aktywowane są także w modelu *mysim* lub *szczurzym*? Byłoby to pomocne w przeprowadzeniu badań zmierzających do identyfikacji rodzaju komórek, w których taka aktywacja ma miejsce oraz wewnątrzkomórkowej lokalizacji badanych białek, szczególnie tych regulowanych przez Nrf2, wytypowanych w prezentowanych badaniach. Rozumiem, że takie analizy w przypadku modelu suwaka mongolskiego były utrudnione lub wręcz niemożliwe z uwagi na brak dostępności specyficznych przeciwciał do badań immunohistologicznych czy immunofluorescencyjnych. Czy tego typu badania prowadzone były w zespole naukowym, w którym pracuje Doktorantka przy zastosowaniu innego modelu? Jeśli tak to jakie są ich wyniki?

Podsumowanie i wnioski są napisane w sposób zwięzły. Na szczególną uwagę zasługują nowatorskie wyniki uzyskane przez Doktorantkę, tj.: 1. wskazanie czynnika transkrypcyjnego Nrf2 jako istotnego regulatora mechanizmów odporności komórek CA2-3 zakrętu zębatego hipokampa na skutki epizodu niedokrwienego, 2. udowodnienie skuteczności farmakologicznej interwencji za pomocą aktywatora ekspresji czynnika Nrf2 w relatywnie szerokim oknie czasowym, co może mieć znaczenie kliniczne, oraz 3.

zidentyfikowanie genów regulowanych przez czynnik Nrf2, których produkty białkowe mogą być zaangażowane w rozwoju tolerancji na niedokrwienie.

W kontekście przeprowadzonych badań uważam za bardzo cenne zamieszczenie oprócz wyników także suplementu (str. 95-97), w formie tabeli 18, którą uważam za bardzo pomocną. Stanowi ona dobre źródło informacji na temat funkcji genów regulowanych przez Nrf2, wskazanych przez Doktorantkę w wyniku przeprowadzenia analizy komputerowej.

Ostatnim rozdziałem pracy jest obszerna bibliografia, zawierająca zarówno starsze, jak najnowsze pozycje co wskazuje na dobrą znajomość tematyki badawczej. Została ona starannie przygotowana, nie mam uwag do tego rozdziału.

4. UWAGI EDYTORSKIE

Z obowiązku recenzenta muszę zwrócić uwagę na fakt, że tekst rozprawy zawiera błędy redakcyjne tj. dość dużą liczbę tzw. literówek, błędów interpunkcyjnych i stylistycznych. Doktorantka nie ustrzegła się również kilku poważniejszych lapsusów i niezręcznych sformułowań takich jak m.in.:

1. Użycie terminu „kontrola dodatnia i ujemna” zamiast kontrola pozytywna i negatywna (str. 39).
2. Kilukrotne użycie terminu „aktywność Nrf2” zamiast ilość lub poziom białka, w miejscach gdzie użycie zamienne nie jest uzasadnione.
3. Zdanie: „Udar mózgu pozostaje drugą, główną przyczyną śmierci oraz trzecią przyczyną niepełnosprawności skracającą lata życia” (str. 16) powinno brzmieć raczej „skracającą długość życia”
4. Autorka używa niewłaściwego terminu „zwierzęta nieleczone” (str. 55) w odniesieniu do zwierząt kontrolnych, którym nie podawano aktywatora Nrf2.
5. Częste skróty myślowe w rodzaju: „wzrost komórek Nrf2 pozytywnych” (np. str. 74) zamiast większa liczba komórek Nrf2 pozytywnych lub wyniki „fałszywie dodatnie” zamiast fałszywie pozytywne (str. 80).

V. PODSUMOWANIE

Podsumowując stwierdzam, że przedstawioną mi do recenzji pracę doktorską oceniam pozytywnie, a krytyczne uwagi, poczynione przez mnie z obowiązku pełnienia funkcji recenzenta, nie umniejszają jej merytorycznej wartości. Autorka wykazała się dobrym warszatem badawczym oraz umiejętnością dobrego opracowania uzyskanych wyników. Tematyka pracy jest istotna z medycznego punktu widzenia, a przedstawione wyniki uzupełniają aktualną wiedzę na temat możliwości modulowania procesów endogennej neuroprotekcji.

W związku z powyższym stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska lekarz weterynarii Anity Lewczuk pt. „Zróżnicowana wrażliwość mózgu suwaka mongolskiego na uszkodzenie niedokrwienno-reperfuzyjne. Udział czynnika transkrypcyjnego Nrf2 w endogennej neuroprotekcji” spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2021 r. poz. 478, 619, 1630).

Wnoszę do Rady Naukowej Dyscypliny Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. Mirosława Mossakowskiego Polskiej Akademii Nauk o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



dr hab. Małgorzata Zawadzka