



UNIwersytet Jagielloński
COLLEGIUM MEDICUM
W KRAKOWIE

Wydział Lekarski

Kraków, dnia 29 sierpnia 2023 r.

RECENZJA

Rozprawy doktorskiej lek. wet. Anity Lewczuk

pt. „Zróżnicowana wrażliwość mózgu suwaka mongolskiego na uszkodzenie niedokrwiennie-reperfuzyjne. Udział czynnika transkrypcyjnego Nrf2 w endogennej neuroprotekcji.”

Udar mózgu, pomimo dekad badań i ciągłego postępu w medycynie, pozostaje jednym z głównych wyzwań. Koszty społeczne i ekonomiczne związane z leczeniem w ostrej fazie udaru, w tym schorzeń współistniejących, a później rehabilitacji, przewlekłej opieki nad osobami z trwałym deficytem neurologicznym, są wysokie. Nadal najskuteczniejszą strategią postępowania w udarze niedokrwiennym, który jest najczęściej występującym typem udaru, jest jak najszybsze przywrócenie prawidłowego krążenia mózgowego. Nie ma żadnej efektywnej klinicznie metody, która by, chociaż przejściowo, działała ochronnie na komórki układu nerwowego narażone na niedokrwienie, czy też zwiększała ich odporność na bodźce uszkodzające.

W przedstawionej pracy doktorskiej lek. wet. Anity Lewczuk wiodącym tematem badań była analiza mechanizmów odporności na niedokrwienie regionu CA 2-3, DG hipokampa suwaka mongolskiego, a zwłaszcza roli czynnika transkrypcyjnego Nrf2. Jako modele doświadczalne Doktorantka wykorzystwała przejściowe niedokrwienie przodomózgowia suwaka mongolskiego oraz ekscytotoksyczne uszkodzenie w organotypowej hodowli skrawków hipokampa szczura.

Przedstawiona rozprawa jest w postaci monografii w klasycznym układzie. Liczy 109 stron, w tym: Wstęp (11 stron), Cel pracy (1 strona), Materiały i Metody (20 stron), Wyniki (25 stron), Dyskusja (20 stron) oraz Podsumowanie, Wnioski, Streszczenia w języku polskim i języku angielskim, podsumowanie innowacyjności rozprawy, Supplement, Spis literatury, a także Wykaz skrótów.

Protokoły przeprowadzonych doświadczeń uzyskały zgody Lokalnej Komisji Etycznej do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach w Warszawie.

Prace były finansowane z grantu OPUS Narodowego Centrum Nauki (2014/15/D/NZ3/02784), grantów wewnętrznych IMDiK PAN oraz grantu POWR.03.02.00-00- 1028/17-00.

Katedra i Klinika Neurologii

30-688 Kraków, ul. Jakubowskiego 2, tel. +48 12 400 25 51, fax +48 12 400 25 67

e-mail: neurologia@cm-uj.krakow.pl

Podział na podrozdziały ułatwia lekturę rozprawy.

Wstęp stanowi przejrzyste wprowadzenie do tematyki pracy. W sposób zwięzły Doktorantka przedstawia procesy komórkowe uruchamiane przez niedokrwienie i reperfuzję mózgu zwracając uwagę na różnice podatności neuronów z różnych obszarów mózgu na bodziec uszkodzający – w tym przypadku niedokrwienie, a zwłaszcza regionów CA1 i CA2-3, DG hipokampa, na których koncentrują się badania przeprowadzone w ramach omawianej pracy doktorskiej. Czytelnik rozprawy otrzymuje nadto informacje na temat czynnika transkrypcyjnego Nrf2, którego rola w tzw. endogennej neuroprotekcji jest zasadniczym przedmiotem rozprawy lek. wet. Anity Lewczuk.

Doktorantka przytacza we Wstępie definicję udaru mózgu z 1978 r. ignorując fakt, że w 2013 r. opublikowano zaktualizowane definicje udaru mózgu i jego poszczególnych typów – stanowisko American Heart Association/American Stroke Association (PMID: 23652265). Jednym z istotnych elementów tej publikacji jest podkreślenie, że definicja udaru niedokrwiennego nie obejmuje globalnego niedokrwienia mózgu (a takie stwierdzenie znalazło się we Wstępie omawianej rozprawy). Również należy zauważyć, że zgodnie z definicją przejściowego epizodu niedokrwiennego, do której odnosi się Autorka (Ref. 4), prócz czynnika czasowego (ustąpienie objawów ogniskowych w ciągu 24 godzin), kluczowym jest brak ostrego zawału widocznego w badaniu neuroobrazowym. Nie jest jasnym, co Autorka ma na myśli pisząc: „Ogniskowe niedokrwienie mózgu jest wynikiem utrudnienia dopływu krwi do mózgu zazwyczaj w wyniku zatoru lub zakrzepu, przy czym występuje krążenie oboczne.” – zator lub zakrzep czego? Czy obecność krążenia obocznego jest warunkiem *sine qua non* wystąpienia udaru niedokrwiennego? Oczekiwania związane z neuroprotekcją nie są bynajmniej niczym nowym i poszukiwanie skutecznej neuroprotekcji mają równie długą historię, jak badania na udarem mózgu (i innymi schorzeniami układu nerwowego).

Rycina 1 lepiej by korespondowała z treścią zdania, które się do niej odwołuje, gdyby prócz uszkodzenia w polu CA1 hipokampa, wyraźniej zaznaczona została odporność na uszkodzenie regionu CA2-3, DG – mikrofotografie tego obszaru analogicznie dla dolnego panelu ukazującego ubytek neuronów w polu CA1.

Cel pracy i poszczególne cele szczegółowe są sformułowane jasno, choć wydaje mi się, że cele szczegółowe 6 i 7 można by połączyć w jeden cel, skoro w obu przypadkach była mierzona ekspresja mRNA tego samego zestawu genów m.in. u zwierząt kontrolnych, nie poddanych uszkodzeniu niedokrwienno-reperfuzyjnemu.

W rozdziale Materiał i Metody zostały przedstawione użyte modele doświadczalne i metody wykorzystane w pracy przez Doktorantkę. Na uwagę niewątpliwie zasługuje przeprowadzona analiza mająca na celu wyodrębnienie najodpowiedniejszego genu referencyjnego do badania ekspresji genów w modelu niedokrwienia mózgu użytego przez lek. wet. Anitę Lewczuk. Przy czym nie znalazłam w tekście rozprawy wyjaśnienia jakie były przesłanki wyboru genu *Bud23*, jako potencjalnego genu referencyjnego dla modelu 5-minutowego niedokrwienia-reperfuzji mózgu suwaka mongolskiego?

Niezbyt precyzyjnie wygląda tytuł Tabeli 2. „Pożywki, roztwory i bufony używane w doświadczeniach” – niewątpliwie niektóre z odczynników znajdujące się w Tabeli 1. są roztworami i buforami, jak na przykład: bufor do lizy komórek, zrównoważony roztwór soli Hanka, czy surowica końska.

Na stronie 32, linia 2 powinno być „*ex vivo*” zamiast „*in vivo*” – zgodnie z brzmieniem podtytułu, do którego czytelnik jest odsyłany. Podanie strony przy odsyłaczu ułatwiłoby znalezienie odpowiedniego fragmentu tekstu zwłaszcza, że Autorka nie numerowała poszczególnych części rozprawy. Nie ma podanego pochodzenia i producenta izofluranu stosowanego do anestezji zwierząt. Nie ma też podanej nazwy aparatu do anestezji, czy pochodzenia maty grzejącej, zastosowanych klipsów naczyniowych.

Rozumiem, że w przypadku kory mózgowej, prążkowiec, opuszka węchowa i mózdzek, izolacja białka i analizy metodą western blot zostały wykonane tak samo, jak w przypadku hipokampa, niemniej nie znalazłam takiej informacji w rozprawie. Czy materiał z obu hipokampów pojedynczego osobnika był pulowany, czy analizowany oddzielnie? – chodzi o doświadczenia *in vivo*. W opisie Ryc. 4 – co oznacza sformułowanie „powtórzenie biologiczne”?

Do analizy zdjęć uzyskanych z mikroskopu konfokalnego użyto „niekomercyjnego programu komputerowego” – czy coś więcej na jego temat można się dowiedzieć? – czy został stworzony przez Autorkę? Jest używany w Pracowni Biologii Molekularnej, Instytucie Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej, czy jest dostępny online? W skrócie – przynajmniej czy ma jakąś nazwę i jakie jest jego pochodzenie. Autorka pisze dalej, że „ (...) wartości były normalizowane względem maksymalnej fluorescencji uzyskanej po podaniu 100 μ M NMDA” – czy to oznacza, że dodanie 100 μ M NMDA do pożywki było kontrolą dla tej części eksperymentu *ex vivo*?

W tekście dotyczącego barwienia hematoksyliną i eozyną punktem odniesienia jest Tabela 4 nie 3. Zresztą można by zawartość Tabeli 4 zamienić na tekst.

Doprecyzować warto opis sposobu oceny histopatologicznej, a zwłaszcza liczenia neuronów w hipokampie (strona 40). Dopiero z Wyników przedstawionych na stronie 55 czytelnik dowiaduje się, że pomiary były prowadzone w polu CA1, natomiast nadal nie wiadomo, gdzie znajdowało owych 5 odcinków o długości 250 μ m, w obrębie których zliczano neurony – schemat, poglądowe zdjęcie, czy opis, byłyby pomocne. Przy okazji – co oznaczają linie na Ryc. 12 przecinające hipokamp? Nie znalazłam informacji ile zwierząt użyto do tych analiz histologicznych.

Również poproszę o wyjaśnienie – tym razem chodzi o analizę *in silico* – w jaki sposób Autorka odniosła się do obszaru hipokampa określonego jako „Ventral CA1 PC”. Według opisu umieszczonego w tekście na stronie 40, region ten nie był uwzględniany w analizach, jest natomiast zaznaczony na Rycinie 5 (błąd w tekście numeracji – strona 41) i Rycinie 14 (w opisie jako „CA1 brzuszny” na mapie – „CA1_V”). I jeśli był uwzględniony w analizach, to czy łącznie z innymi, niż „Dorsal CA1 PC” analizowanymi obszarami hipokampa. Jeśli tak, to na jakiej podstawie uznano, że część grzbietowa pola CA1 ma inną wrażliwość na niedokrwienie niż część brzuszna? Co oczywiście ma konsekwencje, jeśli chodzi o interpretację pozostałych wyników przedstawionych w rozprawie. Również na stronie 41 w tekście jest nieprawidłowy odnośnik do Ryciny przedstawiającej mapę termiczną – Ryc. 12 zamiast Ryc. 14, w tekście nie wiadzie czemu „PER” w rozwinięciu FKPM jest napisane wielkimi literami.

W Tabeli 5 (w tekście na stronie 42 podany jest błędnie numer 4) zostały umieszczone sekwencje starterów identyczne dla *Gapdh* (138) i *Actb*. Nie wiadzie czemu część z podanych numerów dostępu ma kropki na końcu, część nie.

Jaka była używana objętość roztworu do odwrotnej transkrypcji – strona 45 – zgaduję, że 20 μ l?

Wyniki badań są przedstawione w sposób przejrzysty, zilustrowane przy pomocy 16 rycin i 3 tabel (wliczając suplement). Na podkreślenie zasługuje systematyczne podejście do analiz, pomiary wykonane w licznych punktach czasowych, co pomaga zrozumieć dynamikę zmian zachodzących po przejściowym niedokrwieniu mózgu. Niemniej, omówienie uzyskanych wyników budzi nieco zastrzeżeń.

Zaczynając od pierwszych przedstawionych wyników – strona 48. Wyniki ujęte na Ryc. 7 nie upoważniają do stwierdzenia, że „ (...) opuszka węchowa ma poziom czynnika transkrypcyjnego zbliżony do CA2-3, DG, podczas gdy pozostałe badane struktury mają zawartość w jądrach komórkowych Nrf2 podobną do tej obserwowanej w CA1”. O ile rzeczywiście jest znamienna różnica uzyskanych wartości

pomiędzy opuszką węchową a polem CA1 oraz opuszką a prążkowiec (wyższe w opuszcze), o tyle brak jest różnic znamienne statystycznych pomiędzy korą mózgową, prążkowiec, mózdzkiem a CA1 oraz w porównaniu do CA2-3, DG. A oceniając wysokość słupka dla mózdzku, to jest mu chyba bliżej do CA2-3, DG, niż do CA1. Nadinterpretacją jest stwierdzenie, że w „pozostałych (tj. w porównaniu z CA 2-3, DG) strukturach niska immunoreaktywność korelowała z niską immunoreaktywnością HO-1. (...) zmiany poziomu Nrf2 korelują ze zmianami regulowanymi przez niego białka”. Przy okazji – dlaczego na reprezentatywnych błotach dla Nrf2 są pokazane po 2 próbki na strukturę (ryc. 7C), a w przypadku HO-1 – po jednej (Ryc. 7D)?

Wątpliwości budzi interpretacja wyników na stronie 50. Autorka pisze m.in., że „Jego (tj. KEAP1) poziom w CA 2-3, DG nie zmieniał się istotnie po I/R. (...) Otrzymane wyniki poziomu KEAP1 korelują ze zmianami immunoreaktywności Nrf2 w regionie CA1 (Ryc. 8A).” Na Ryc. 8A jedyna znamienna zmiana w czasie dotycząca pola CA1 to wzrost zawartości Nrf2 w jądrowej frakcji po 24 godzinach od I/R. Pozostałe znamienne wzrosty w czasie dotyczą CA 2-3, DG. Natomiast na Ryc. 8B zaznaczone znamienne zmiany w czasie dotyczące pola CA1 i KEAP1 są obecne we wszystkich punktach czasowych do 36 godzin (w opisie podano, że do 24 godzin) po I/R. Nie rozumiem dlaczego dla KEAP1 punktem odniesienia była kontrola CA1 (jak głosi legenda pod Ryc. 8) – czy rzeczywiście także wartości uzyskane dla regionu CA 2-3, DG były porównywane z kontrolą CA1? Jeśli tak, to dlaczego?

Doktorantka pisze, że „Jedynie w 36 godzinie reperfuzji w CA1 obserwowano przejściowy, krótkotrwały wzrost immunoreaktywności HO-1.” – Zgodnie z tym, co przedstawia Ryc. 9A, nie była to jednak zmiana statystycznie znamienna, a przynajmniej nie została zaznaczona. A co za tym idzie, kolejny wniosek, że „Przyrost ten może być związany z opisanym wzrostem Nrf2 we frakcji jądrowej w CA1 w 24 godzinie (...)” jest nieuzasadniony.

W dalszym ciągu tego podrozdziału, w omówieniu wyników przedstawionych na Ryc. 9, czytamy: „W CA 2-3, DG po 2 godzinach (GPx1) oraz po 1 godzinie (GCLM) pojawił się wzrost immunoreaktywności tych białek, który osiągnął swój szczyt w 48 i 72 godzinie reperfuzji.” Analizując zmiany w czasie dla GPx1 w obszarze CA 2-3, DG przedstawione na Ryc. 9B, znamienny statystycznie wzrost immunoreaktywności jest zaznaczony jedynie dla 48 i 72 godzin, natomiast po 2, 24, 48 i 72 godzinach jest znamienna różnica pomiędzy CA1 a CA 2-3, DG. Z kolei dla białka GCLM oznaczanego w regionie CA 2-3, DG znamienny wzrost immunoreaktywności jest zaznaczony dla 48 i 72 godzin; we wcześniejszych punktach czasowych jest jedynie różnica pomiędzy badanymi obszarami hipokampa (Ryc. 9D). Następnie jest napisane: „W badaniu podjednostki katalitycznej ligazy glutaminianowo-cysteinowej różnicę w immunoreaktywności pomiędzy CA1 a CA 2-3, DG zaobserwowano w 2 godzinie reperfuzji (Ryc. 9 C, E, F). Wzrost immunoreaktywności GCLC w CA 2-3, DG trwał do 72 godziny reperfuzji.” I znowu, analizując wyniki przedstawione na Ryc. 9 C widać, że zaznaczone znamienne różnice pomiędzy badanymi regionami hipokampa są dla 2, 24, 48 i 72 godzin, natomiast istotny statystycznie wzrost w czasie immunoreaktywności GCLC w CA 2-3, DG pojawia się dopiero w 48 godzinie i rzeczywiście jest także obecny po 72 godzinach od I/R.

W przypadku oceny efektywności sulforafanu w modelu ekscytotoksyczności *ex vivo* – którego obszaru dotyczyły pomiary w barwieniu jodkiem propidyny – tylko CA1, czy całego hipokampa? Ani opis umieszczony w rozdziale Materiał i Metody, ani legenda pod Ryc. 10 nie dają jednoznacznej odpowiedzi. Zaznaczenie analizowanego obszaru na fotografiach byłoby pomocne w lepszym zrozumieniu przedstawionych wyników.

Zgodnie z logiką omawiania ilustracji Ryc. 12 powinna być umieszczona przed obecną Ryc. 11.

Niezbyt fortunnym jest podpis osi rzędnych na Ryc. 13 – „wzrost ekspresji” sugeruje zmianę zachodzącą w czasie, czy pod wpływem jakiegoś bodźca, natomiast z kontekstu opisu wynika, że chodzi o ekspresję

pewnych genów wyższą w określonym obszarze w porównaniu z innym. Analogiczna uwaga dotyczy legendy Ryc. 14 – chodzi o wzrost/zmniejszenie ekspresji, czy wyższą/niższą ekspresję?

Czy Doktorantka może zaproponować wyjaśnienie dlaczego 2/3 spośród wybranych na podstawie analizy *in silico* genów miało istotnie wyższą, a nie niższą ekspresję w regionie CA1 hipokampa w porównaniu z CA2-3, DG u suwaka mongolskiego?

W przypadku analizy ekspresji mRNA *Fzd7* w czasie po I/R w obszarze CA 2-3, DG Autorka pisze, że „jest widoczna tendencja, wskazująca na wzrost ekspresji” – jakie były zatem wartości p, w oparciu o które Doktorantka użyła słowa „tendencja”? To samo pytanie dotyczy wniosków na temat ekspresji mRNA i produktu białkowego genu *Camk1* w tym obszarze i mRNA *Phgdh* w CA1. Natomiast stwierdzenie, że „Poziom ekspresji mRNA *Tdo2* w regionie CA1 był wyższy niż w CA 2-3, DG w kontroli” nie znajduje odzwierciedlenia na Ryc. 21G – a przynajmniej nie zostało to zaznaczone.

Biorąc pod uwagę fakt, że nie odnotowano znamiennych zmian w ekspresji mRNA genu *Fzd7* w obszarze CA 2-3, DG po I/R, znamienne wzrosty w tym regionie hipokampa odnotowano dla 5, a nie 6 spośród badanych genów. Natomiast nie rozumiem sformułowania, że „nie są to geny, których mRNA przeważają w kontrolnym, prawidłowym hipokampie” (strona 70).

W legendzie do Ryc. 22 E błędnie podano nazwy białek. A prócz tego w opisach Ryc. 20, 21, 22 został wskazany punkt czasowy 36h nie znajdujący swojego odzwierciedlenia na wykresach. Kropki w ułamkach dziesiętnych, zapis genów zwykłą czcionką zamiast kursywą, zdarza się niestety też na innych rycinach.

W klarownie napisanej Dyskusji, Autorka rzeczowo odnosi się do uzyskanych przez siebie wyników konfrontując je z danymi opublikowanymi przez innych autorów. Nie ustrzegła się jednak pewnych nieścisłości.

Na stronie 74 w części tekstu zawierającej odniesienie do Ref. 153 jak rozumiem fragment „(...) wzrost komórek Nrf2 pozytywnych w obszarze okołozawałowym (...)” powinien brzmieć „wzrost liczby komórek Nrf2-pozytywnych w obszarze okołozawałowym” – co jednak ma odmienne znaczenie. I dalej, odwołując się do tej samej pracy Doktorantka pisze: „Wzrost Nrf2 korelował ze wzrostem poziomu białek przez niego regulowanych (...)” – *de facto* w pracy liczone jedynie komórki wykazujące barwienie na obecność poszczególnych białek, nie dokonywano innych pomiarów ilościowych. Nie udało mi się zidentyfikować publikacji, do której Autorka odwołuje się na tej samej stronie, jako Ref. 155 – w podanym spisie literatury pod nr 155 nazwisko pierwszego autora brzmi inaczej, niż podane w tekście rozprawy, a treść samej publikacji nie koresponduje z informacjami podanymi w Dyskusji. Za nadinterpretację uważam opis wyników pochodzących z Ref. 156. Według Doktorantki we fragmencie dotyczącym immunoreaktywności jądrowego Nrf2: „(...) w 30 minucie reperfuzji pojawiła się tendencja wzrostowa.” Tyle, że w pracy porównywano grupy zwierząt, którym podawano bądź nie genisteinę i porównania te wykonywano w kilku punktach czasowych, natomiast nie analizowano zmian w czasie dla poszczególnych grup. Rzeczywiście po 30 minutach od reperfuzji jest znamienne większa zawartość we frakcji jądrowej białka Nrf2 w grupie nie otrzymującej substancji czynnej, ale w porównaniu do zwierząt, które otrzymały genisteinę. Natomiast nie analizowano, czy różnice pomiędzy grupą kontrolną a zwierzętami, którym nie podano genisteiny są znamienne. Także przedstawienie wyników z Ref. 157 budzi pewne zastrzeżenia. W rozprawie czytamy, że „(...) 3 dni po 20 minutowym zaciśnięciu dwóch tętnic szyjnych badacze zaobserwowali wzrost całkowitego i cytoplazmatycznego Nrf2 (...)”. W oryginalnej publikacji natomiast widać, że wzrost całkowitego Nrf2 jest znamienne, ale w grupie zwierząt, którym podano ryfampicynę, zaś w przypadku zwierząt, którym nie podano leku, zmiana ekspresji białka nie jest znamienne. I kończąc z omawianym akapitem Dyskusji – Doktorantka pisze omawiając wyniki przedstawione w Ref. 158, że autorzy „(...) zaobserwowali nieznaczny wzrost

immunoreaktywności Nrf2 we frakcji jądrowej otrzymanej z regionu CA1 hipokampa w 48 godzinie reperfuzji.” – no cóż, ta różnica jest znamienna statystycznie.

Na stronie 90 nieprawidłowo zostały podane odwołania do poszczególnych części Rycin 19 i 22, natomiast brak jest odwołań przy okazji omawiania zmian ekspresji dla genów *Stc2* i *Phgdh* – mRNA i białka.

Podsumowanie i Wnioski są w pełni uzasadnione przez przedstawione w rozprawie wyniki i jasno sformułowane.

Pewne zastrzeżenia budzi strona redakcyjna rozprawy. Wprowadzanie skrótów powinno następować przy pierwszym ich użyciu, po czym, konsekwentnie, skróty już wprowadzone powinny być używane w tekście. W przedstawionej pracy Autorka w sposób dość swobodny stosuje się do tej zasady. Począwszy od Streszczenia – na stronie 9 jest wprowadzony skrót HO-1, który na kolejnych stronach bywa używany na przemian z pełną nazwą. Z kolei skrót SFN dla sulforafanu pojawia się w tekście po raz pierwszy na stronie 25 mimo, że nazwa cząsteczki była już wymieniana wcześniej. Podobnie jest w przypadku NMDA, Nrf2, uszkodzenia niedokrwienno-reperfuzyjnego, organotypowej hodowli skrawków hipokampa, etc. Czasem skróty nie są w ogóle rozwijane – np. na str. 19: HIF1, VEGF, IL, TNF.

Zdarzają się stylistyczne wpadki, które niekorzystnie wpływają na odbiór pracy, jak np.:

Str. 9: „W niniejszej rozprawie doktorskiej, że aktywność Nrf2 jest wyższa ...”

Str. 9: (...) różnice w aktywności Nrf2 korelują z poziomem białek (...) takich jak oksygenaza hemowa (...), podjednostka katalityczna (GCLC) i modulatorowej (GCLM) ...”

Str. 15: „Wyselekcjonowane geny i ich produkty białkowe mogą uczestniczyć w mechanizmach odporności (...) i rzucają nowe spojrzenie na sposoby w jakie komórki nerwowe chronią się same i naprawiają po uszkodzeniu.” – Geny rzucają spojrzenie? Co naprawiają komórki nerwowe? Się? Inne komórki? Inne organy?

Str. 16: „krótkie okno terapeutyczne” – raczej mówimy o „wąskim oknie terapeutycznym”

Str. 83: „FSP1 posiada zarówno zdolność indukcji apoptozy jak i ochroną komórek”

Słowo „poziom” w znaczeniu „stężenie, zawartość, koncentracja” jest zdecydowanie nadużywane.

Stężenia nie wyraża się w ng – jakie były więc stężenia matryc cDNA, o których mowa na stronie 46?

W Wykazie skrótów zbędne jest umieszczanie dodatkowych informacji typu „aktywator Nrf2” przy sulforafanie, czy „metoda detekcji białek” przy „Western blot”; „marker frakcji cytoplazmatycznej” przy „dehydrogenazie młeczanowej”, „marker frakcji jądrowej” przy „białku macierzy jądrowej p84” (notabene angielska nazwa to „THO complex subunit 1”).

Zamiast „Cornu ammonis” powinno być „cornu Ammonis”.

Błędnie podana jest nazwa angielska podjednostki modulatorowej ligazy glutaminianowo-cysteinowej. Nie tyle epizod niedokrwienno-reperfuzyjny, co uszkodzenie niedokrwienno-reperfuzyjne – tłumacząc „injury”.

W ułamkach dziesiętnych stosujemy przecinki, nie kropki, w przeciwieństwie do zapisów w legendach dla wielu rycin. Geny powinny być zapisywane kursywą – Ryc. 17, 18.

Ponieważ nie jest to arkusz erraty, podaję tylko przykłady zastrzeżeń.

Odważnie brzmi sformułowanie „mojej grupy” – strona 21.

„Powierzchnia obrzęku mózgu” nie jest poprawnym określeniem. Zwłaszcza, że publikacji do której się odnosi doktorantka, nasilenie obrzęku mózgu było mierzone przez pomiar zawartości wody – „brain water content” – Ref. 200.

Referencje – w tekście pojawia się odnośnik do ref. 98 przed ref. 96 i 97 (strona 22). W przypadku Ref. 3 nie ma informacji o wydawnictwie.

I jeszcze dwa pytania na zakończenie.

Ponieważ dla kliniki istotny jest efekt funkcjonalny stosowanych interwencji, chorego najbardziej interesuje w jaki sposób leczenie poprawi, czy wręcz przywróci, sprawność utraconą w wyniku choroby – w tym przypadku przez udar mózgu. Czy są jakieś badania dokumentujące, że aktywacja Nrf2, na przykład przez sulforafan, dawała pozytywne efekty czynnościowe w niedokrwieniu mózgu? (o sukcesie omaveloxone zarejestrowanego do leczenia ataksji Friedreicha Doktorantka wspomina w dysertacji). Może wyniki badań własnych?

Biorąc pod uwagę uzyskane wyniki, jaka jest opinia Doktorantki na temat przydatności analiz *in silico* w badaniach o zbliżonej tematyce, co przedstawione w rozprawie? Jak ocenia użyteczność danych pochodzących z badań wykorzystujących metody wielkoskalowych analiz w innym gatunku, nawet niezbyt odległym filogenetycznie?

Podsumowując, pragnę podkreślić, że przedstawiona rozprawa świadczy o dobrym opanowaniu warsztatu naukowego Doktorantki, umiejętności krytycznej oceny uzyskanych wyników i ich interpretacji w odniesieniu do istniejącej literatury przedmiotu. Uzyskane przez lek. wet. Anitę Lewczuk wyniki dostarczają niewątpliwie cennych informacji na temat mechanizmów endogennej neuroprotekcji, z a zwłaszcza roli czynnika Nrf2. Można je uznać za bardzo dobry punkt wyjścia do dalszych badań nad odpornością neuronów na czynniki uszkodzające.

Uważam, że omawiana praca lek. wet. Anity Lewczuk pt. „Zróżnicowana wrażliwość mózgu suwaka mongolskiego na uszkodzenie niedokrwienno-reperfuzyjne. Udział czynnika transkrypcyjnego Nrf2 w endogennej neuroprotekcji.” spełnia określone ustawowo warunki stawiane rozprawie doktorskiej i wnoszę do Rady Naukowej Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. Mirosława Mossakowskiego Polskiej Akademii Nauk w Warszawie o dopuszczenie lek. wet. Anity Lewczuk do dalszych etapów przewodu doktorskiego.


Prof. dr. hab. Joanna Pera