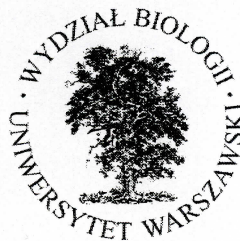




UNIwersytet
Warszawski



Wydział Biologii
Instytut Biochemii, Zakład Regulacji Metabolizmu

dr hab. Katarzyna Winiarska, prof. ucz.

e-mail: k.winiarska5@uw.edu.pl

tel. 22 5543208

Warszawa, 15.05.2023

Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr Justyny M. Gargaś

***pt. Rola oddziaływań między komórkami glejowymi
w patogenezie następstw asfiksji neonatalnej***

wykonanej w Instytucie Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN im. M. Mossakowskiego pod opieką promotorską Pani dr hab. Joanny Sypeckiej, prof. IMDiK PAN z udziałem Pani dr hab. Małgorzaty Ziemki-Nałęcz jako Promotorki pomocniczej

Asfiksja okołoporodowa jest główną przyczyną neurodegeneracyjnych uszkodzeń mózgu u noworodków. Szacuje się, że – nawet w krajach wysokorozwiniętych – problem ten dotyczy kilku/1000 urodzeń. W wyniku następstw asfiksji co roku na świecie umiera około miliona noworodków. Już same te liczby dobitnie świadczą o zasadności badań będących przedmiotem recenzowanej rozprawy.

Główna część wyników przedstawionych w rozprawie została opublikowana w *Int J Mol Sci* (IF = 6,208; 140 pkt. MEiN); Pani mgr Justyna M. Gargaś jest pierwszą Autorką tej pracy. Uzyskane przez Doktorantkę wyniki przyczyniły się także do powstania dwóch innych, współautorskich, publikacji naukowych – w *Pharmacol Rep* (IF = 3,919; 100 pkt. MEiN) oraz w *Mol Neurobiol* (IF = 5,686; 100 pkt. MEiN).

Merytoryczna ocena pracy

Wstęp pracy Autorka rozpoczęła szczegółowym opisem komórek glejowych, następnie nieco pobieżniej, ale za to z wyraźnym ukierunkowaniem na doświadczalną część rozprawy, scharakteryzowała wybrane cytokiny, a końcowe podrozdziały poświęciła asfiksji okołoporodowej. Tak skonstruowany Wstęp bardzo dobrze wprowadza czytelnika w tematykę rozprawy. Muszę jednak przyznać, że – najciekawszy w mojej opinii – podrozdział poświęcony strategiom terapeutycznym pozostawił mi pewien niedosyt (wróć do tego w dalszej części recenzji).

Opisane w pracy eksperymenty zostały prawidłowo zaplanowane i przeprowadzone za pomocą adekwatnych metod (w dalszej części recenzji poproszę Doktorantkę o przedyskutowanie pomniejszych wątpliwości metodycznych, jakie mi się nasunęły). Sposób przedstawienia wyników także nie budzi zastrzeżeń, a na wyróżnienie z pewnością zasługują znakomite zdjęcia mikroskopowe (szczególnie te spod mikroskopu konfokalnego). Dyskusja jest bardzo rzetelna – co warto podkreślić, Autorka podchodzi bardzo krytycznie do uzyskanych przez siebie wyników, ale potrafi też uwypuklić znaczenie swoich osiągnięć.

A niewątpliwie największym i niepodważalnym osiągnięciem Doktorantki jest ustalenie warunków współhodowli komórek glejowych z izolowanych frakcji (komórki mikrogleju, astrocyty i progenitory oligodendrocytów) i opracowanie szczerzego modelu asfiksji neonatalnej *in vitro*. Mój niekłamany podziw budzi ogromna praca, jaką Doktorantka włożyła w ustalenie warunków prowadzenia hodowli komórkowych (skład pożywek, rodzaj materiału powlekającego naczynia hodowlane, gęstość wysiewu komórek).

Autorka dowiodła użyteczności opracowanego przez siebie modelu asfiksji *in vitro*, z powodzeniem wykorzystując go w badaniach nad aktywnością sekrecyjną i wzajemną komunikacją humoralną komórek tworzących neuroglej. Co więcej, można się spodziewać, że model ten znajdzie zastosowanie także w innych badaniach dotyczących niedokrwienia/hipoksji-ischemii.

Zagadnienia do dalszej dyskusji

- 1) We Wstępie pracy Autorka nadmienia o badaniach klinicznych nad zastosowaniem melatoniny w terapii asfiksji. Proszę o rozwinięcie tego tematu – jak zaawansowane są te badania? Czy jest znany dokładny molekularny mechanizm działania melatoniny jako czynnika przeciwdziałającego następstwom asfiksji?
- 2) Głównym sensorem stężenia tlenu w komórce są czynniki transkrypcyjne HIFs. Proszę o przedstawienie aktualnego stanu wiedzy na temat znaczenia HIFs w asfiksji. Czy w jej przypadku możliwe wydaje się zastosowanie modulacji aktywności HIFs jako skutecznej strategii terapeutycznej?
- 3) Autorka wielokrotnie wspomina o znaczeniu stresu oksydacyjnego w patofizjologii komórek glejowych. Proszę o sprecyzowanie, jakie są główne źródła ROS w tych komórkach.

- 4) Proszę o wyjaśnienie treści kryjącej się w zdaniu: „W warunkach hipoksyjnych, astrocyty wspierają funkcje metaboliczne neuronów dostarczając substratów energetycznych powstałych na drodze glikolizy beztlenowej [5].” (Wstęp, str. 27; pisownia oryginalna).
- 5) Autorka – słusznie – podkreśla w Dyskusji, że opracowany przez nią szcurzy model asfiksji neonatalnej *in vitro* jest zgodny z zasadą 3R. Proszę o rozwinięcie, czym jest ta zasada i podanie przykładów jej zastosowania we własnej praktyce doświadczalnej Doktorantki.
- 6) Kwestie metodyczne:
 - Fizjoksję (5% tlenu) osiągnęto, hodując komórki w inkubatorze IncuSafe MCO-170M (PHCbi). Czy wszystkie procedury (np. wymiana pożywki) były wykonywane przy takim właśnie stężeniu tlenu? Czy komórki nie były okresowo narażane na kontakt z atmosferycznym stężeniem tlenu?
 - W celu określenia poziomu białek wydzielanych przez komórki glejowe, Doktorantka albo posługiwała się techniką ELISA, albo korzystała z Luminexu. Proszę o określenie, jakie były kryteria wyboru metody oznaczeń.

Formalna ocena pracy

Doktorantka przygotowała klasyczną, książkową wersję dysertacji, opatrzoną streszczeniem w języku polskim i angielskim. Układ pracy jest prawidłowy, a podział na rozdziały – w pełni logiczny. Na uwagę zasługuje osobny rozdział „Innowacyjność rozprawy”, syntetycznie przedstawiający jej nowatorskie aspekty.

Szkoda natomiast, że Autorka zrezygnowała z numerowania rozdziałów i podrozdziałów pracy. Naruszeniem obowiązującej konwencji jest także umieszczenie tytułów tabel pod nimi, zamiast nad nimi.

Autorka ma lekkie pióro, jasno formułuje myśli - pracę czyta się z prawdziwą przyjemnością. Dysertacja nie jest jednak całkowicie wolna od błędów terminologicznych (te nieszczęsne „organy”!), stylistycznych (żargon, zapożyczenia z języka angielskiego) i edytorskich. Błędy te skrupulatnie wytknęłam Doktorantce w kularowej rozmowie, ale nie wymieniam ich w szczegółowo recenzji, gdyż uważam, że mają marginalne znaczenie dla końcowej oceny pracy. Dodam natomiast, że Autorce należy się pochwała za bardzo elegancką szatę graficzną pracy.

Podsumowanie i wniosek końcowy

W mojej opinii, rozprawa doktorska Pani mgr Justyny M. Gargaś w pełni spełnia wymogi określone w art. 187 *Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce*. Wnoszę zatem do Rady Naukowej IMDiK PAN o dopuszczenie Pani mgr Justyny M. Gargaś do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu, w dyscyplinie nauki medyczne.

Ponadto, zważywszy: 1) istotne znaczenie opracowanego przez Doktorantkę modelu asfiksji neonatalnej *in vitro* dla dalszego rozwoju badań; 2) publikację głównej części wyników w bardzo dobrym czasopiśmie (*Int J Mol Sci* o pięcioletnim IF = 6,628 i 140 pkt. MEiN), wnioskuję o wyróżnienie rozprawy.



Katarzyna Winiarska