



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 Gargaś pt.

„ROLA ODDZIAŁYWAŃ MIĘDZY KOMÓRKAMI GLEJOWYMI W PATOGENEZIE NASTĘPSTW ASFIKSJI NEONATALNEJ”

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska poświęcona została badaniu zaburzeń funkcji komórek glejowych w patogenezie asfiksji neonatalnej.

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. Gliogeneza jest ważnym etapem rozwoju układu nerwowego i jest najbardziej intensywna w okresie okołoporodowym oraz we wczesnym rozwoju postnatalnym. Właściwości gleju w tym okresie różnią się znacząco od właściwości tych komórek w dorosłym organizmie. Na szczególną uwagę zasługują progenitory oligodendrocytów (OPCs), zaliczane do makrogleju, z których różnicują się oligodendrocyty zdolne do wytwarzania osłonki mielinowej. Komórki te są szczególnie wrażliwe na wpływ bodźców patofizjologicznych i zaburzenia ich funkcji są kluczowym elementem uszkodzeń tkanki nerwowej pod wpływem czynników patofizjologicznych oraz urazów w okresie okołoporodowym. Pomimo wieloletnich i wielokierunkowych badań nad mechanizmami uruchamianymi w wyniku hipoksji/ischemii (HI) medycyna neonatalna ciągle nie dysponuje w pełni efektywną metodą terapeutyczną skutecznie niwelującą skutki asfiksji okołoporodowej. A zatem poszukiwania tej strategii muszą być kontynuowane. Skuteczna terapia powinna obejmować kluczowe mechanizmy patogenetyczne.

Doktorantka swoją uwagę skupiła na właściwościach komórek glejowych, których rola w uszkodzeniach hipoksyjnych nie jest dobrze poznana, chociaż wiadomo, że z pewnością są ważnym elementem kaskady zdarzeń patologicznych w przebiegu hipoksji/ischemii.

Wartość ocenianej dysertacji podnosi fakt, iż badania zostały wykonane w ramach projektów badawczych finansowanych przez NCN, jak również z projektu POWER. Ponadto należy podkreślić, że część przedstawionych w dysertacji wyników została już opublikowana w 3 oryginalnych pracach, które ukazały się w impaktowanych czasopismach: *International Journal of Molecular Sciences*, *Pharmacological Reports* i *Molecular Neurobiology*. Pani mgr Gargaś jest pierwszym autorem w jednej pracy, a w dwóch kolejnych drugim autorem. A zatem, zarówno sama tematyka badań, jak też część wyników dysertacji zostały pozytywnie ocenione przez recenzentów tych publikacji.

Układ pracy jest typowy dla prac doświadczalnych. Rozprawa zawiera 113 stron podzielonych na 7 rozdziałów: 1. Wstęp, 2. Cele pracy, 3. Materiały i Metody, 4. Wyniki, 5. Dyskusja, 6. Podsumowanie i wnioski i 7. Bibliografia. Każdy z rozdziałów uzupełniony jest szczegółowymi podrozdziałami. Praca zawiera także streszczenie: po polsku i po angielsku, bardzo dobrze, przejrzyste opracowane, a także alfabetyczny wykaz stosowanych skrótów. Cytowana literatura jest bogata liczbowo (225 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, niezwykła staranność edycyjnego przygotowania rozprawy (nie znalazłam nawet literówek).

We wstępie rozprawy doktorantka przedstawia problem badawczy, zwracając szczególną uwagę na te elementy, które stały się podstawą do sformułowania celów pracy. Autorka przedstawia charakterystykę komórek glejowych z uwzględnieniem ich specyficznej roli na wczesnych etapach rozwoju jak również w warunkach patologicznych, omawia chemokiny i interleukiny, których rola może być szczególnie ważna w warunkach patologicznych. W ostatniej części wstępu znajdziemy charakterystykę asfiksji okołoporodowej z uwzględnieniem obecnie stosowanych metod terapeutycznych.

Doktorantka wskazuje tu między innymi na hipotermię terapeutyczną, która o ile zostanie zastosowana w krótkim czasie po epizodzie HI może być skuteczna, ale w przypadku silnych uszkodzeń jest niewystarczająca do zniwelowania uszkodzeń.

Obniżanie temperatury jako strategia obronna występuje u wielu gatunków zwierząt, jest to mechanizm nazywany anapireksją. Badania nad tym zjawiskiem w znacznym stopniu przyczyniły się do zoptymalizowania stosowanej w terapii hipotermii. W tym miejscu chciałabym zapytać doktorantkę o przykłady gatunków zwierząt, u których ta strategia występuje i na wskazanie różnic między hipotermią i anapireksją.

Wstęp w logiczny sposób prowadzi do kolejnej części rozprawy, czyli 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 komórek glejowych, w warunkach normoksji fizjologicznej i pożywce bezsurowiczej. Następny etap to ocena wpływu hipoksji/ischemii na przeżywalność, proliferację i morfologię szczurzych neonatalnych komórek glejowych. Kolejny – analiza sekretom komórek glejowych. Ostatni etap badań miał na celu sprawdzenie wpływu oddziaływań między komórkami glejowymi na profil sekrecyjny badanych komórek.

Metodyka przeprowadzonych badań jest imponująca, przede wszystkim w zakresie różnorodności zastosowanych metod i technik. Były to badania prowadzone *in vitro*, w których wykorzystano hodowle poszczególnych frakcji komórek glejowych tj. mikrogleju, progenitorów oligodendrocytów oraz astrocytów; pochodzących z mózgów osesków szczura (24-48h *postpartum*) obu płci stada Wistar. Pierwsza część badań miała na celu optymalizację warunków hodowli komórek glejowych tzn. określenie gęstości wysiewania poszczególnych typów komórek, jak również składu pożywki hodowlanej. Następnie w celu odwzorowania warunków asfiksji neonatalnej komórki poddano czasowemu ograniczeniu dostępu do składników odżywczych i tlenu (OGD, ang. oxygen-glucose deprivation). Czas trwania HI eksperymentalnie oszacowano na 50 min. Prosiłabym o wyjaśnienie co było markerem/wskaźnikiem do wytypowania właściwego czasu trwania procedury deprywacji tlenu i glukozy. W kolejnym etapie badań z użyciem testów immunoenzymatycznych i immunologicznych autorka dokonała ilościowej oceny ekspresji wybranych substancji aktywnych, zaangażowanych w oddziaływania międzykomórkowe, w tym czynników troficznych, takich jak insulinopodobny czynnik wzrostu typu 1 (IGF-1) oraz czynnik neurotroficzny pochodzenia mózgowego (BDNF). Analizie poddano również zmiany poziomu ekspresji wybranych cytokin, ich receptorów i interleukin pod wpływem HI. Wybrane metody analizy statystycznej nie budzą zastrzeżeń.

Wyniki swojej pracy autorka przedstawiła 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 komórek glejowych.

Na szczególne podkreślenie zasługuje zastosowanie właściwych dla komórek warunków tlenowych, czyli 5% udziału tlenu w mieszaninie gazów w atmosferze inkubatora, w którym hodowane są komórki, a nie jak dotychczas standardowo stosowanego stężenia, czyli 21%

O2. Odwzorowywanie w modelach badawczych warunków fizjologicznych, czy też patologicznych w przypadku modelowania zaburzeń występujących w organizmie ludzkim jest jednym z warunków, gwarantujących uzyskanie wyników, które mogą być wykorzystywane do planowania nowych metod terapeutycznych u człowieka. Ten aspekt pracy, czyli uwzględnienie w warunkach hodowli stężenia tlenu typowego dla komórek uważam za bardzo cenny. Procedura ta będzie mogła znaleźć zastosowanie w testowaniu substancji o potencjalnym działaniu neuroprotekcijnym w patologii niedokrwienia/niedotlenienia okołoporodowego.

W kolejnym etapie badań mgr Gargaś podjęła się zweryfikowania wpływu okresowego niedoboru tlenu i glukozy (ang. OGD, *oxygen-glucose deprivation*) na przeżywalność, proliferację, fenotyp i morfologię neonatalnych szczyrzonych komórek glejowych. Na uwagę zasługuje odkrycie, że część progenitorów oligodendrocytów, pomimo iż jest szczególnie wrażliwa na zmiany mikrośrodowiska wewnątrzkomórkowego, jest zdolna do różnicowania, jednak proces dojrzewania komórek, i tym samym nabycie zdolności do syntezy składników mieliny, na skutek HI jest spowolniony.

W kolejnym cyklu badań autorka dokonała analizy profilu sekrecyjnego komórek glejowych. Komórki gleju produkują szereg czynników immunomodulujących, w tym cytokin o działaniu prozapalnym lub przeciwzapalnym w odpowiedzi na zaburzenia homeostazy i bodźce patofizjologiczne. Tym samym mogą odgrywać rolę zarówno w procesach neurodegeneracji, ale również regeneracji uszkodzonej tkanki nerwowej i przywrócenia fizjologicznego funkcjonowania tworzących ją komórek. Doktorantka wykazała, że poszczególne typy komórek glejowych cechują się odmiennym profilem sekrecyjnym. Natomiast w hodowlach mieszanych komórek glejowych stwierdzono oddziaływanie wzajemnie modulujące w przypadku kilku spośród analizowanych czynników.

Jednym z kluczowych czynników zaangażowanych w proces mielinogenezy jest insulinopodobny czynnik wzrostu 1 (IGF-1), którego poziom uwalniania przez poszczególne frakcje komórek glejowych weryfikowała doktorantka. Autorka stwierdziła najwyższy poziom IGF-1 w astrocytach. Poznanie czynników modyfikujących profil uwalniania IGF-1 może być kluczowe dla opracowania nowych terapii po asfiksji okołoporodowej, ale także w przypadku innych chorób, w których stwierdza się zaburzenia mielinizacji.

Doktorantka wykazała również, że BDNF (neurotroficzny czynnik pochodzenia mózgowego) jest jednym z głównych czynników troficznych wspierających prawidłowe funkcjonowanie oligodendrocytów. Potwierdziła podwyższony poziom BDNF po HI, co może mieć korzystny wpływ na mikrośrodowisko komórkowe i sprzyjać uruchomieniu mechanizmów neuronaprawczych.

W ostatnim etapie badań, autorka skupiła się na analizie wybranych chemokin i ich receptorów, a także interleukin pełniących wiodącą rolę w odpowiedzi immunologicznej.

Uzyskane wyniki badań dowiodły, że po HI dochodzi do zmian w ekspresji chemokin, ich receptorów a także interleukin w komórkach glejowych, co wskazuje na ich rolę immunomodulacyjną. Warto podkreślić jeden z wyników dotyczący istotnie wyższego poziomu IL-10 w komórkach poddanych procedurze OGD. Ze względu na przeciwzapalne oddziaływanie tej interleukiny, jest ona brana pod uwagę jako potencjalny środek terapeutyczny po wystąpieniu asfiksji okołoporodowej. Badania doktorantki potwierdzają słuszność takiego podejścia.

Poznanie wzajemnych oddziaływań między komórkami gleju i ich profilu sekrecyjnego jest kluczowe dla wytypowania czynników, które mogą wspierać funkcję neuroprotekcijną tych komórek. Ważną strategią obrony przed rozwojem uszkodzeń mózgu jest wzmacnianie naturalnych endogennych mechanizmów neuroprotekcyjnych. Poznanie sekretomu zarówno monokultur konkretnych komórek glejowych, a także zmian w sekretomie, które są wynikiem wzajemnych oddziaływań komórek glejowych pozwala na poznanie tych mechanizmów w komórkach glejowych.

Dyskusja świadczy o dużej wnikliwości doktorantki. Pani mgr Gargaś 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 Gargaś są 4 jasno przedstawione wnioski, uzasadnione uzyskanymi wynikami, które potwierdzają zrealizowanie postawionych celów badawczych.

Podsumowując, chciałabym podkreślić nowatorski charakter przeprowadzonych badań. Doktorantka opracowała wydajną metodę pozyskiwania i hodowli w warunkach normoksji fizjologicznej wszystkich trzech głównych typów neonatalnych szczurzych komórek glejowych. Metoda ta będzie mogła być wykorzystana do modelowania *in vitro* wybranych okołoporodowych stanów patofizjologicznych i do testowania wpływu potencjalnych substancji terapeutycznych na komórki glejowe. Przeprowadzone badania wykazały, że w przypadku wybranych czynników oraz receptorów komórkowych, oddziaływania międzykomórkowe mają znamienny wpływ na ich ekspresję w warunkach hipoksji/ischemii. Uzyskane wyniki mogą znaleźć zastosowanie w poszukiwaniu nowych miejsc uchwytu dla leków niwelujących uszkodzenia hipoksyjno-ischemiczne na wczesnym etapie rozwoju mózgowia.

Jak wspominałam wcześniej wyniki zamieszczone w rozprawie zostały opublikowane w postaci 3 prac oryginalnych w czasopismach 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 119 i 157, natomiast praca Gargas i wsp. z 2022 roku w ogóle nie jest cytowana w tekście, a powinna być, ponieważ opisuje opracowaną przez doktorantkę

metodę hodowli komórek glejowych, co jest ważnym elementem dysertacji. Oczywiście, w związku z tym, że nie wszystkie wyniki zostały opublikowane wskazanie ich logicznego związku w postaci dysertacji było jak najbardziej uzasadnione.

W podsumowaniu chciałabym wyraźnie podkreślić, że mgr Justyna Gargaś wynikami swojej pracy zrealizowała zamierzone cele. Było to możliwe dzięki dobrze zaplanowanym badaniom, a także ich konsekwentnej realizacji z użyciem adekwatnych technik i metod badawczych. Przedstawione wyniki w istotny sposób uzupełniają istniejącą wiedzę wnosząc zupełnie nowe elementy w zrozumienie udziału komórek glejowych w rozwój uszkodzeń indukowanych niedotlenieniem/niedokrwieniem mózgowia. Ponadto rozprawa pozwala stwierdzić, że doktorantka posiada ogólną wiedzę teoretyczną w dyscyplinie biologia medyczna i umiejętności samodzielnej 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 Gargaś 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 29. maja 2023

UZASADNIENIE WNIOSKU O WYRÓŻNIENIE ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Pani magister Justyny Gargaś pt.

**„ROLA ODDZIAŁYWAŃ MIĘDZY KOMÓRKAMI GLEJOWYMI W PATOGENEZIE
NASTĘPSTW ASFIKSJI NEONATALNEJ”**

Rozprawa doktorska p. mgr Gargaś zasługuje na wyróżnienie ze względu na jej nowatorski charakter, wysoką wartość poznawczą i potencjał aplikacyjny. Metoda hodowli komórek glejowych opracowana przez doktorantkę będzie mogła znaleźć zastosowanie w badaniach patomechanizmu schorzeń, w których rola komórek glejowych jest potwierdzona.

Prof. dr hab. Justyna Rogalska

Toruń, dnia 29. maja 2023