



Kraków 29.05.2023

Prof. dr hab. n. med. Joanna Mika
Zakład Farmakologii Bólu
Instytut Farmakologii im. Jerzego Maja
Polskiej Akademii Nauk

OCENA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

mgr Justyny Magdaleny Gargaś

zatytułowanej

**„Rola oddziaływań między komórkami glejowymi
w patogenezie następstw asfiksji neonatalnej”**

Przedstawiona do oceny praca doktorska Pani mgr Justyny Gargaś wykonana pod kierunkiem Promotora Pani dr hab. Joanny Sypeckiej oraz Promotora pomocniczego Pani dr hab. Małgorzaty Ziemki-Nałęcz bardzo dobrze wpisuje się w aktualny nurt badań prowadzonych w ramach Zakładu Neurobiologii Naprawczej Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. Mirosława Mossakowskiego Polskiej Akademii Nauk. Pomimo, że na przestrzeni ostatnich lat rośnie ilość badań nad mechanizmami uruchamianymi w wyniku neonatalnej hipoksji-ischemii, niemniej jednak nadal brak jest skutecznej terapii neuroprotektoryjnej. Stosowana w pierwszych godzinach po asfiksji okołoporodowej hipotermia znacząco zmniejsza śmiertelność i ryzyko ciężkiej niepełnosprawności, jednak w wielu przypadkach okazuje się całkowicie nieskuteczna. Doktorantka w swojej pracy słusznie zwraca uwagę na to, że istnieje pilna potrzeba poszukiwania nowych punktów uchwytu do opracowywania efektywnej terapii. Podkreśla również, że badania ostatnich lat wciąż przynoszą nowe informacje na temat roli komórek glejowych w rozwoju i funkcjonowaniu ośrodkowego układu nerwowego. Jednakże poznanie złożoności zachodzących interakcji międzykomórkowych, a także wytypowanie czynników immunologicznych zaangażowanych w procesy degeneracyjne i regeneracyjne wciąż wymaga wnikliwych badań.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska pt. „Rola oddziaływań między komórkami glejowymi w patogenezie następstw asfiksji neonatalnej” posiada logiczny układ, dojrzałe opracowanie, a także szczegółową dyskusję wyników co ważne częściowo już opublikowanych w 3 pracach oryginalnych, wskazuje to na dobrze opanowaną przez Doktorantkę umiejętność pracy naukowej.

W przedstawionej do oceny pracy układ jest klasyczny, na początku znajduje się Wykaz skrótów oraz Streszczenie w języku polskim i angielskim, a także w punktach wymienione są elementy innowacyjności rozprawy. Dysertacja składa się z typowych rozdziałów a mianowicie: Wstęp, Cel, Materiały i metody, Wyniki, Dyskusja, Podsumowanie i Wnioski oraz Bibliografia (225 starannie dobranych pozycji piśmiennictwa). Rozprawa zawiera 113 stron, 32 ryciny oraz 9 tabel. Dysertacja jest starannie przygotowana pod względem językowym, graficznym i redakcyjnym, a konstrukcja zgodna z obowiązującymi wymogami ustawowymi dla oryginalnej rozprawy doktorskiej. Doktorantka wykazała, że badania były finansowane przez Narodowe Centrum Nauki w ramach dwóch projektów Opus (2014/15/B/NZ4/01875) i WEAVE-UNISONO (2021/03/Y/NZ4/00214) oraz przez Program Operacyjny Wiedza Edukacja Rozwój 2014-2020 projekt współfinansowany ze środków Europejskiego Funduszu Społecznego (POWR.03.02.00-00-I028/17-00), a także przez Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. Mirosława Mossakowskiego Polskiej Akademii Nauk w ramach grantu statutowego.

We Wstępie Autorka konsekwentnie wprowadza czytelnika w główne zagadnienia rozprawy doktorskiej, na 15 stronach w sposób syntetyczny i klarowny opisuje funkcje i zaangażowanie w utrzymywanie homeostazy w ośrodkowym układzie nerwowym trzech typów komórek glejowych: oligodendrocytów, astrocytów i mikrogleju. Ponadto podkreśla znaczenie czynników prozapalnych i przeciwzapalnych, w tym chemokin i interleukin, wydzielanych w wyniku aktywacji wyżej wymienionych komórek, co świadczy o doskonałym zrozumieniu przez Doktorantkę zjawiska dwoistej natury badanych komórek. Dokonuje również wnikliwego przeglądu literaturowego i omawia asfiksję okołoporodową, w tym jej przyczyny, klasyfikację, kryteria diagnostyczne, a także dostępną terapię. Autorka bardzo dobrze wprowadza czytelnika w tematykę pracy, w tym rozdziale szczególną uwagę zwracają 3 starannie opracowane ryciny oraz również 3 tabele.

W drugim rozdziale Doktorantka przedstawiła główne założenia pracy oraz w 4 punktach szczegółowe - bardzo ambitne cele - realizowane w ramach rozprawy doktorskiej takie jak: 1. opracowanie modelu hodowli trzech głównych typów komórek glejowych pochodzących z mózgów szczurów neonatalnych; 2. stworzenie modelu OGD, czyli wybranie warunków *in vitro* umożliwiających modelowanie neonatalnej hipoksji-ischemii, polegającej na okresowym ograniczeniu dostępu komórek do tlenu i glukozy; 3. zbadanie wpływu OGD na przeżywalność, proliferację i morfologię wybranych komórek glejowych, a także na ekspresję szeregu czynników troficznych, cytokin i ich receptorów, a także 4. ocenę wpływu współhodowli komórek glejowych na wydzielanie wytypowanych czynników po zastosowaniu procedury OGD, w celu określenia potencjalnego modulacyjnego wpływu oddziaływań międzykomórkowych na profil sekrecyjny.

W rozdziale Materiały i metody Autorka zawarła najważniejsze informacje dotyczące sposobu prowadzenia pierwotnych hodowli glejowych (w tym mieszanych), a także przeprowadzania doświadczeń w warunkach *in vitro* w modelu neonatalnej hipoksji-ischemii. Co ważne Doktorantka udokumentowała, że wszystkie badania zostały wykonane po uzyskaniu zgody Lokalnej Komisji Etycznej ds. Doświadczeń na Zwierzętach, a także w sposób wyczerpujący przedstawiła zastosowane analizy statystyczne, które posłużyły do oceny uzyskanych wyników. Zwraca uwagę bardzo dobry warsztat metodyczny, na przykład oprócz oznaczeń klasycznych przy pomocy testu immunocytochemii i Elisa, w swoich badaniach wykorzystywała stosunkowo nową metodę Luminex. I tu miałabym prośbę o komentarz, jak Doktorantka ocenia wady i zalety testu immunoenzymatycznego Elisa w porównaniu z metodą Luminex.

W rozdziale Wyniki Autorka prezentuje przejrzyste dane uzyskane w swoich eksperymentach na 28 złożonych rycinach oraz w postaci 2 tabel – pragnę podkreślić, że badania prowadzone w pierwotnych hodowlach glejowych są bardzo trudne i żmudne. Logicznie zaplanowane eksperymenty i konsekwentna ich realizacja przyniosła efekty w postaci klarownie opisanych i graficznie przedstawionych wyników. W pierwszym bardzo wymagającym etapie eksperymentów Autorka dokonała optymalizacji warunków hodowli komórek mikrogleju, astrocytów i oligodendrocytów oraz ich współhodowli. Bardzo ciekawym wynikiem jest wykazanie, że głównym źródłem IGF-1 w warunkach *in vitro* są głównie astrocyty, natomiast mikroglej również jednakże w dużo mniejszym stopniu. Jest to


ważna informacja, ponieważ IGF-1 w ośrodkowym układzie nerwowym silnie wpływa zarówno na proliferację, jak i dojrzewanie oligodendrocytów. Za ważne i nowatorskie podejście uważam porównywanie wyników z hodowli prowadzonych w monofrakcjach komórek glejowych z ich współhodowlami. Uzyskane wyniki wskazują, jak ważne było to podejście dzięki któremu możemy choć częściowo poznać modulujący wpływ parakrynych oddziaływań międzykomórkowych – na przykład poziom czynnika BDNF we współhodowlach oligodendrocytów i astrocytów okazał się znacząco niższy aniżeli w wymienionych frakcjach komórkowych hodowanych oddzielnie. Ponadto we współhodowlach oligodendrocytów i mikrogleju odnotowano zwiększone wydzielanie CXCL1 przez oligodendrocyty za sprawą zaktywowanego mikrogleju, natomiast pozostałe przebadane cytokiny IL1 β , IL6, IL10, CCL2, CCL3, CXCL10 nie ulegały takim wpływom. Na uznanie zasługuje zarówno staranne przeprowadzenie badań, jak i oryginalne podejście eksperymentalne. Pragnę również podkreślić, że wyniki badań zostały już częściowo opublikowane w 3 pracach oryginalnych, w jednej Doktorantka jest pierwszym autorem **Gargas J.**, Janowska J., Ziabska K., Ziemka-Nałęcz M., Sypecka J. *Neonatal Rat Glia Cultured in Physiological Normoxia for Modeling Neuropathological Conditions In Vitro* w czasopiśmie *International Journal of Molecular Sciences* **2022**; natomiast w pozostałych dwóch jest drugim autorem Ziabska K.; **Gargas J.**, Sypecka J., Ziemka-Nałęcz M. *The Impact of the Histone Deacetylase Inhibitor Sodium Butyrate on Microglial Polarization after Oxygen and Glucose Deprivation* w *Pharmacological Reports* w **2022** oraz Janowska J., **Gargas J.**, Ziemka-Nałęcz M., Zalewska T., Sypecka J. *Oligodendrocyte Response to Pathophysiological Conditions Triggered by Episode of Perinatal Hypoxia-Ischemia: Role of IGF-1 Secretion by Glial Cells* w *Molecular Neurobiology* w **2020**. Co ważne wymienione publikacje zostały wykonane pod kierunkiem zarówno Promotora jak i Promotora pomocniczego.

Niezwykle cenną częścią dysertacji, świadcząca o dojrzałości naukowej Doktorantki jest Dyskusja w której zwraca uwagę spójna interpretacja wyników w oparciu o dostępną literaturę. W pierwszej kolejności Doktorantka w ciekawy sposób dyskutuje wpływ hipoksji-ischemii na komórki glejowe, wskazując jak ważnym elementem eksperymentów prowadzonych w warunkach *in vitro* jest prawidłowa optymalizacja warunków hodowli. W dalszej części Doktorantka dyskutuje jak wybrane związki biomimetyczne stosowane do pokrywania powierzchni hodowlanych wpływają na przeżywalność, morfologię i stopień

prolifracji progenitorów komórek glejowych. Ostatnia część dyskusji jest szczególnie interesująca, Doktorantka wykazuje w niej, że zdolności wydzielnicze komórek glejowych oraz ekspresja wybranych receptorów w szczurzym modelu hipoksji-ischemii w warunkach *in vitro* podlegają modulacji poprzez oddziaływania międzykomórkowe w hodowlach mieszanych. Określenie złożoności tych interakcji komórkowych leżących u podłoża obserwowanych neurodegeneracyjnych zaburzeń na skutek neonatalnej hipoksji-ischemii w ośrodkowym układzie nerwowym jest niezmiernie istotne z klinicznego punktu widzenia. Autorka słusznie wskazuje, że uzyskane wyniki mogą w przyszłości przyczynić się do opracowywania strategii terapeutycznych w celu zminimalizowania skutków asfiksji okołoporodowej. Dysertacja zakończona jest 4 głównymi wnioskami, w których Doktorantka trafnie podsumowuje rezultaty swoich badań.

Mimo bardzo dobrej pracy, Doktorantka nie uniknęła drobnych błędów edytorskich np. na wykresie Ryc. 12 – 24h, 72h i 5DIV – skrót 5DIV jest zaskakujący i nie ma jego wyjaśnienia w opisie figury – na szczęście pojawia się w dziale Wykaz skrótów, ale i tak pozostaje nie jasne czy to było faktycznie równe 120h czy może inaczej? Na str. 61 jest „porlifracje” a powinno być „prolifracje”.

Podsumowując, przeprowadzone badania wymagały solidnego warsztatu metodycznego, a także nakładu pracy Doktorantki. Omówione wyżej drobne nieliczne niedociągnięcia nie umniejszają wartości przedstawionej do recenzji dysertacji. Z przyjemnością, zatem pragnę stwierdzić, że rozprawa doktorska autorstwa mgr Justyny Magdaleny Gargaś zatytułowana „Rola oddziaływań między komórkami glejowymi w patogenezie następstw asfiksji neonatalnej” spełnia określone ustawowo warunki stawiane rozprawie doktorskiej, dlatego mam zaszczyt wnosić do Wysokiej Rady Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. Mirosława Mossakowskiego Polskiej Akademii Nauk w Warszawie o dopuszczenie mgr Justyny Magdaleny Gargaś do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie biorąc pod uwagę ważność podjętego tematu badań, jego znaczenie dla zrozumienia funkcjonowania ośrodkowego układu nerwowego w warunkach asfiksji neonatalnej, a także fakt iż wyniki zostały już częściowo opublikowane w 3 renomowanych czasopismach składam wniosek o przyznanie Doktorantce wyróżnienia.


Prof. dr hab. n. med. Joanna Mika