



Kraków 27.02.2022

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

OCENA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

**Mgr Justyny Janowskiej
zatytułowanej**

„Rola zmian w funkcjonowaniu oligodendrocytów w patogenezie zaburzeń istoty białej będących skutkiem asfiksji neonatalnej”

Przedstawiona do oceny praca doktorska mgr Justyny Janowskiej wykonana pod kierunkiem Promotorki dr hab. Joanny Sypeckiej oraz Promotorki pomocniczej dr hab. Małgorzaty Ziemki-Nałęcz bardzo dobrze wpisuje się w tematykę badawczą Zakładu Neurobiologii Naprawczej Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. Mirosława Mossakowskiego PAN W Warszawie. Dane literaturowe wskazują, że asfiksja okołoporodowa, czyli niedobór tlenu w okresie okołoporodowym, powoduje uszkodzenia mózgu noworodków, a w konsekwencji jest drugą najczęstszą przyczyną ich zgonów. Obecnie brak jest skutecznego leczenia tych przypadków, w terapii wykorzystuje się metodę hipotermii terapeutycznej, która przyczynia się do zmniejszenia śmiertelności. Prowadzone wieloletnie badania dzieci poddanych tej procedurze, wskazują jednakże na zmiany w istocie białej związane z rozwojem encefalopatii hipoksyjno-ischemicznej. Istotę białą w ośrodkowym układzie nerwowym tworzą skupiska aksonów neuronów otoczonych osłonką mielinową, która wytwarzana jest przez oligodendrocyty. Wiadomo, że komórki te są szczególnie wrażliwe na uszkodzenie w okresie okołoporodowym, natomiast najnowsze dane literaturowe wskazują również na ekspansję komórek progenitorowych oligodendrocytów po niedotlenieniu-niedokrwieniu. W świetle powyższych danych, tematyka przedstawionej do oceny pracy doktorskiej wydaje się bardzo trafna.

Hipoteza badawcza pracy doktorskiej zakłada, że pod wpływem hipoksji-ischemii progenitory oligodendrocytów mają zaburzony program wzrostu i różnicowania, który promuje utrzymanie ich w stanie progenitorowym i ogranicza dojrzewanie, co prowadzi do nieprawidłowej mielinizacji.

Na początku pracy przedstawionej do oceny znajduje się Wykaz skrótów oraz Streszczenie w języku polskim i angielskim; a także w punktach wymienione są elementy innowacyjności rozprawy. Praca składa się z typowych rozdziałów a mianowicie: Wstęp; Założenia i cel pracy; Materiały i metody; Wyniki; Dyskusja; Wnioski i Bibliografia (209 starannie dobranych pozycji piśmiennictwa). Rozprawa zawiera 126 stron, 50 rycin i 5 tabel. Poprawny styl, logiczny układ pracy, prawidłowe cytowanie literatury, a także prezentacja i dyskusja wyników wskazuje na dobrze opanowaną przez Doktorantkę umiejętność pracy naukowej. Warto podkreślić, że badania których rezultaty stały się podstawą niniejszej rozprawy doktorskiej były wykonane w ramach realizacji 4 projektów finansowanych przez Narodowe Centrum Nauki. Dwa z tych projektów typu Opus były realizowane przez mgr Justynę Janowską pod kierunkiem Promotorki (2014/15/B/NZ4/01875) i Promotorki pomocniczej (00582/NZ3/B/27/2017). Natomiast, co warto podkreślić w roku 2018 Doktorantka uzyskała grant typu PRELUDIUM (1494/NZ3/N/31/2018) pt. „Czynniki indukowane hipoksją a zaburzenia dojrzewania oligodendrocytów w modelu asfiksji neonatalnej *in vitro*”, a następnie w roku 2020 stypendium ETIUDA (2020/36/T/N24/00144) pt. „Rola zmian w funkcjonowaniu oligodendrocytów w patogenezie zaburzeń istoty białej będących skutkiem asfiksji neonatalnej”. Taka umiejętność zdobywania funduszy świadczy niewątpliwie o dojrzałości naukowej Doktorantki i jej zaangażowaniu w prowadzone badania.

Warto również podkreślić, że wyniki które zostały zamieszczone w rozprawie doktorskiej są już częściowo opublikowane w pracach oryginalnych o zasięgu międzynarodowym, w pierwszej z nich „*Impact of neonatal hypoxia-ischaemia on oligodendrocyte survival, maturation and myelinating potential*” Journal of Cellular and Molecular Medicine 2018 (IF₂₀₁₈= 4,438) Doktorantka jest drugim autorem, natomiast w pozostałych dwóch a mianowicie: „*The Differentiation of Rat Oligodendroglial Cells Is Highly Influenced by the Oxygen Tension: In Vitro Model Mimicking Physiologically Normoxic Conditions*.” International Journal of Molecular Sciences 2018 (IF₂₀₁₈= 4,320); oraz „*Oligodendrocyte Response to Pathophysiological Conditions Triggered by Episode of*

Perinatal Hypoxia-Ischemia: Role of IGF-1 Secretion by Glial Cells” Molecular Neurobiology 2020 (IF₂₀₂₀= 5,590) jest pierwszym autorem. Sumaryczny Impact Factor z tych wyżej wymienionych prac wynosi 14,348.

W pierwszym rozdziale, na 10 stronach Wstępu, Doktorantka w sposób syntetyczny i klarowny opisuje encefalopatię hipoksyjno-ischemiczną, następnie metody jej leczenia ze szczególnym uwzględnieniem hipotermii terapeutycznej oraz zaburzeń zachodzących w rozwoju istoty białej. Dokonuje również wnikliwego przeglądu literaturowego i omawia terapię o potencjalnym działaniu mielinoprotekcyjnym, a szczególnie możliwość zastosowania insulinopodobnego czynnika wzrostu typu 1 (IGF-1) w terapii encefalopatii hipoksyjno-ischemicznej. Doktorantka bardzo dobrze wprowadza czytelnika w tematykę pracy, w tym pierwszym rozdziale szczególną uwagę zwraca 6 bardzo pomocnych i starannie opracowanych rycin.

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 metody izolacji i hodowli szczurzych komórek progenitorowych oligodendrocytów w warunkach normoksji fizjologicznej i pożywcze bezsurowiczej; 2. Ocena proliferacji komórek progenitorowych oligodendrocytów oraz dojrzewania oligodendrocytów w modelach asfiksji neonatalnej; 3. Ocena zmian stężenia insulinopodobnego czynnika wzrostu typu 1 w tkance nerwowej po hipoksyjno-ischemicznym uszkodzeniu mózgu szczura; 4. Ocena potencjalnego działania insulinopodobnego czynnika wzrostu typu 1 w celu wspomaganie oligodendrogenyzy i mielinizacji w modelu *in vitro* oraz *ex vivo*.

W rozdziale trzecim Doktorantka zawarła najważniejsze bardzo pomocne informacje dotyczące przeprowadzonych badań i analizy statystycznej - na uznanie zasługuje bardzo dobry warsztat metodyczny. Co ważne Doktorantka udokumentowała, że wszystkie eksperymenty zostały wykonane po uzyskaniu zgody Lokalnej Komisji Etycznej ds. Doświadczeń na Zwierzętach. Następnie szczegółowo i przystępnie omówiła zastosowane modele badawcze tj. model *in vivo* hipoksji-ischemii neonatalnej, model *ex vivo* - hodowle organotypowe skrawków hipokampa oraz model *in vitro* - hodowle komórek progenitorowych oligodendrocytów. W następnym podrozdziale opisała zastosowaną w badaniach *in vitro* i *ex vivo* procedurę krótkotrwałego ograniczenia dostępu do tlenu i

glukozy. W kolejnej części przedstawiła szczegółowo zastosowane liczne metody biochemiczne, molekularne i mikroskopowe.

W czwartym rozdziale Doktorantka rzetelnie i przejrzysto omawia wyniki swoich eksperymentów. Na uznanie zasługuje oryginalny pomysł zrealizowanych badań oraz staranne opracowanie materiału doświadczalnego. Uzyskane przez Doktorantkę wyniki są interesujące. Rezultaty przedstawiła w postaci tabeli oraz na 38 rozbudowanych rycinach zawierających zarówno liczne wykresy jak i zdjęcia mikroskopowe. W pierwszym bardzo wymagającym etapie eksperymentów dokonała optymalizacji warunków hodowli komórek progenitorowych oligodendrocytów. W tym celu zbadła wydajność izolacji metodą wytrząsania mieszanej hodowli glejowej oraz jej homogenność, a także określiła wpływ gęstości wysiewania komórek, składu pożywki hodowlanej oraz wpływu warunków tlenowych na ich proliferację i różnicowanie. W drugim etapie badań dokonała oceny wpływu hipoksji-ischemii neonatalnej na proliferację i dojrzewanie komórek progenitorowych oligodendrocytów w modelu *in vivo*, a następnie ocenę wpływu ograniczenia dostępu do składników odżywczych i tlenu na wzrost oligodendrocytów w modelach *ex vivo* i *in vitro*. W trzecim etapie badań dokonała oceny wpływu zewnątrzkomórkowego insulinopodobnego czynnika wzrostu typu 1 na proliferację i dojrzewanie oligodendrocytów w modelach zarówno *in vitro*, jak i *ex vivo*.

Dyskusja pracy napisana jest poprawnie. W pierwszej kolejności Doktorantka w ciekawy sposób dyskutuje rozbieżności literaturowe wynikające z odmiennych warunków hodowli komórek progenitorowych oligodendrocytów, wskazując jak ważnym elementem doświadczeń jest prawidłowa optymalizacja warunków eksperymentalnych, co świadczy o Jej dojrzałości naukowej. W dalszej części Doktorantka logicznie interpretuje wyniki swoich badań i dyskutuje z dostępną literaturą. Podkreśla, że uzyskane wyniki badań w modelu *in vitro*, a potwierdzone eksperymentami *ex vivo* i *in vivo* wskazują, że w zaburzeniu programu różnicowania oligodendrocytów istotny udział ma stan hipoksji w tkance nerwowej wywołany niedotlenieniem organizmu. Niedobór tlenu przyczynia się między innymi do nadekspresji czynników transkrypcyjnych, które wpływają na dojrzewanie oligodendrocytów. Ponadto wskazuje, że rozwijającemu się stanowi zapalnemu tkanki nerwowej towarzyszy silna aktywacja astrocytów, która odgrywa istotną rolę w zahamowaniu mielinizacji. Ciekawa jestem opinii Doktorantki na temat zaangażowania komórek mikrogleju, a także innych

komórek immunologicznych w patogenezę następstw asfiksji neonatalnej. Ostatnia część dyskusji jest szczególnie interesująca, Doktorantka wykazuje w niej, że lokalne zmiany w stężeniu insulinopodobnego czynnika wzrostu typu 1 w tkance nerwowej po hipoksji-ischemii wpływają znacząco na potencjał komórek progenitorowych oligodendrocytów do różnicowania. Co ważne insulinopodobny czynnik wzrostu typu 1 suplementowany w niskim stężeniu przyczynia się do promowania dojrzewania komórek, zaś w wysokim stężeniu – do proliferacji komórek progenitorowych oligodendrocytów, co jak wskazuje Doktorantka jest istotną informacją dla planowania strategii terapeutycznych dla wszystkich chorób o podłożu demielinizacyjnym. Praca doktorska zakończona jest 7 wnioskami, w których Doktorantka trafnie podsumowuje wyniki swojej pracy naukowej.

Mimo bardzo dobrej pracy, Doktorantka nie uniknęła drobnych niedociągnięć edytorskich np. zabrakło w wykazie wyjaśnienia skrótu „OPCs”, ponadto na str. 57 jest powołanie na tabelę nr 1, a powinno być na nr 5; w rozdziale 3.1.4. jest „krótkotrwałe”, zamiast „krótkotrwałe”, na str. 47 i 49 dwukrotnie pojawia się % tj. $4,28\pm 0,93\%$ oraz $10,4\pm 1,33\%$, na str. 99 – „.... wsp. W swych...”; a na str. 107 „Wniki badań”, które jednak nie umniejszają wartości przedstawionej do recenzji pracy.

Z przyjemnością, zatem pragnę stwierdzić, że przedstawiona do recenzji praca autorstwa mgr Justyny Janowskiej zatytułowana „Rola zmian w funkcjonowaniu oligodendrocytów w patogenezie zaburzeń istoty białej będących skutkiem asfiksji neonatalnej” spełnia określone ustawowo warunki stawiane rozprawie doktorskiej, dlatego mam zaszczyt wnosić do Wysokiej Rady Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. Mirosława Mossakowskiego PAN w Warszawie o dopuszczenie mgr Justyny Janowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie z uwagi na istotną wartość merytoryczną pracy, której wyniki zostały już częściowo opublikowane w renomowanych czasopismach o łącznym Impact Factor 14,348 składam wniosek o przyznanie Doktorantce wyróżnienia.

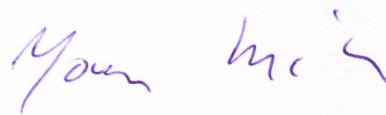
Prof. dr hab. n. med. Joanna Mika

UZASADNIENIE WNIOSKU O WYRÓŻNIENIE ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

mgr Justyny Janowskiej

**p.t. „Rola zmian w funkcjonowaniu oligodendrocytów w patogenezie zaburzeń
istoty białej będących skutkiem asfiksji neonatalnej”**

W uzasadnieniu wniosku o wyróżnienie chcę podkreślić znaczącą wartość poznawczą badań nad rolą oligodendrocytów w patogenezie zaburzeń istoty białej będących skutkiem asfiksji neonatalnej. Wysoki poziom przeprowadzonych w dysertacji eksperymentów, potwierdza fakt ich opublikowania w wiodących czasopismach o wysokim współczynniku oddziaływania (sumaryczny Impact Factor wynosi 14,348).



Prof. dr hab. n. med. Joanna Mika