Warszawa, dn. 21.01.2019

dr hab. Małgorzata Zawadzka
Instytut Biologii Doświadczalnej PAN
im. Marcelego Nenckiego
w Warszawie

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr inż. Weroniki Krzyżanowskiej pt.: „Modulacja transporterów układu glutaminergicznego przez ceftriakson i N-acetylocysteinę a rozwój tolerancji mózgu na niedokrwienie."

Udar mózgu jako druga, po chorobie niedokrwiennej serca, przyczyna śmierci na świecie stanowi istotny problem dla współczesnej medycyny, i to nie tylko z powodu tak wysokiej śmiertelności, ale również dlatego, że jest jedną z najczęstszych przyczyn długotrwałej niepełnosprawności dorosłych. Ponadto, etiologia zawału mózgu jest złożona i wieloczynnikowa, a profilaktyka, podobnie jak w przypadku innych schorzeń układu krążenia, nieefektywna, co pogłębia trudności leczenia przyczynowego. Niezależnie jednak od przyczyn udaru, w wyniku epizodu niedokrwiennego dochodzi do powstawania ogniska uszkodzenia tkanki nerwowej otoczonego obszarem objętym niedokrwieniem, tzw. półcieniem, w którym możliwe jest przywrócenie homeostazy i ochrona komórek nerwowych przed zniszczeniem. Jedyną skuteczną strategią leczenia jest więc jak najszybsze przywrócenie przepływu krwi w obszarze półcienia, jednak długość okna terapeutycznego dla kilku dostępnych terapii rekanalizacyjnych wciąż pozostaje limitowana. Wydaje się więc, że przedmiotem intensywnych badań powinny stać się strategie terapeutyczne ukierunkowane na neuroprotekcję ponieważ, niezależnie od czynnika etiologicznego, dawałyby możliwość poprawy klinicznej.
W ten bardzo aktualny nurt badań podstawowych nakierowanych w perspektywie na opracowanie strategii neuroprotekcyjnych opartych na rozwoju tolerancji mózgu na uszkodzenie wpisuje się przedstawiona mi do recenzji dysertacja Pani mgr inż. Weroniki Krzyżanowskiej pod tytułem „Modulacja transporterów układu glutaminergicznego przez ceftriakson i N-acetylocysteinę a rozwój tolerancji mózgu na niedokrwienie".

Praca skonstruowana jest w sposób typowy dla tego rodzaju opracowań i składa się z następujących części: wstęp, cele pracy, metody, wyniki, dyskusja, podsumowanie i wnioski. Pracę zamyka streszczenie w języku polskim i angielskim oraz bibliografia. W tekście nie znalazłam niestety, zwykle cennego dla czytelnika, wykazu zastosowanych skrótów.

Przedmiotem badań Doktorantki było określenie roli transporterów glutaminianu GLT-1 i xc- w patofizjologii udaru niedokrwiennego mózgu. Cel ten postanowiono osiągnąć poprzez zbadanie efektów

modulowania ekspresji tych białek w wyniku przeprowadzenia procedury wywołania ogniskowego udaru mózgu poprzedzonego podawaniem zwierzętom CEF i NAC, czyli tzw. doświadczalnego hartowania mózgu. Problem badawczy został poprawnie rozpoznany i podjęcie badań jest w pełni uzasadnione. Tytuł pracy wprawdzie dobrze opisuje podjętą problematykę, jednak Autorka nie ustrzegła się w nim pewnej nieścisłości, sformułowanie: „modulacja transporterów układu glutaminergicznego" powinno być wg. mnie zastąpione sformułowaniem: „modulowanie ekspresji transporterów glutaminianu".

Wstęp jest 25-cio stronicowym rozdziałem, który Autorka rozpoczyna od przedstawienia aktualnej definicji udaru niedokrwiennego, jego epidemiologii, etiologii i omówienia dostępnych strategii leczenia przyczynowego udaru. Cenne jest przypomnienie aktualnej definicji udaru, szczególnie, że wprowadza ona jako kryterium rozpoznania obecność ogniska zawału, co, jak słusznie podkreśla Autorka, pozwala na rozpoznanie udaru niedokrwiennego u pacjentów, u których widoczne jest ognisko zawału mimo, że objawy neurologiczne ustąpiły przed upływem 24 godz. W części tej nie ustrzegła się jednak Autorka pewnej niezręczności pisząc o udarze mózgu jako „trwałym, nagłym i ogniskowym uszkodzeniu ośrodkowego układu nerwowego (mózgu, siatkówki oka albo rdzenia kręgowego). Chodziło zapewne o to, że udar niedokrwienny to trwałe, nagłe uszkodzenie dotyczące różnych struktur w obrębie ośrodkowego układu nerwowego (mózgu, siatkówki oka albo rdzenia kręgowego).

Następne podrozdziały dotyczą mechanizmów rozwoju tolerancji mózgu na niedokrwienie oraz mechanizmów patofizjologii udaru, głównie ekscytotoksyczności glutaminianu. Wstęp kończy opis roli poszczególnych elementów przekaźnictwa glutaminergicznego, a więc samego glutaminianu, jego receptorów i transporterów w udarze niedokrwiennym mózgu. Wstęp stanowi dobry punkt wyjścia do przedstawienia wyników badań własnych i ich dalszej analizy i interpretacji.

W rozdziale drugim Autorka sformułowała cel badawczy, którym była ocena roli wybranych transporterów glutaminianu w rozwoju tolerancji mózgu na niedokrwienie. Dla osiągnięcia celu głównego sformułowano cele szczegółowe, czyli przeprowadzenie oceny wybranych parametrów doświadczalnych takich jak: deficytu neurologicznego, objętości uszkodzonej tkanki, ekspresji i lokalizacji badanych transporterów glutaminianu w wybranych strukturach mózgu oraz poziomu zewnątrzkomórkowego glutaminianu.

Dokładna charakterystyka grup doświadczalnych i liczebność zwierząt w poszczególnych grupach nie budzą wątpliwości. Model doświadczalny jakim jest czasowe, odwracalne zamknięcie tętnicy środkowej mózgu jest „złotym standardem" doświadczalnym w badaniach dotyczących niedokrwienia mózgu, ponieważ najlepiej odzwierciedla patofizjologię udaru mózgu. Wymaga on jednak od operującego wyjątkowej precyzji i należy wysoko ocenić doskonałe umiejętności Doktorantki w tej dziedzinie. Zastosowane w pracy metody badawcze zostały opisane w sposób właściwy i odpowiadający przedmiotowi badań. Jedynie opisując czynniki

interwencyjne Doktorantka powołała się na dane literaturowe dotyczące dawek stosowanych w doświadczeniach, nie podając jednak danych bibliograficznych tych publikacji (strona 28).

Rozdział Wyniki jest 36-cio stronicową częścią pracy, zilustrowaną 37 rycinami i podzieloną na podrozdziały odpowiadające zakresowi wykonanych badań. W opisie uzyskanych wyników pojawia się kilka niejasności, np.:

1. Autorka pisze na str. 41, w opisie wyników oznaczania deficytu neurologicznego, że u zwierząt kontrolnych, poddanych działaniu czynników interwencyjnych, ale u których zamiast udaru wykonano operację pozorowaną nie stwierdzono deficytu neurologicznego, co przedstawiono na rycinie 2. Nie znajduję na tej rycinie takiego wyniku. Ta sama uwaga dotyczy rycin 3 i 4, na których również nie umieszczono wyników uzyskanych w grupach kontrolnych, co błędnie sugeruje odnośny tekst (str.42 i 43).

2. Podczas lektury rozdziału 4.8 dotyczącego identyfikacji komórek produkujących transportery glutaminianu nasuwa się pytanie: jaką metodą dokonywano analizy uzyskanych obrazów immunoflurescencyjnych (ryciny 23-38), pochodzących, jak zaznaczono w opisie każdej z rycin, od kilku osobników (n=3). Czy analizowano rozmieszczenie tych białek w strukturach i jak oceniano różnice? Innymi słowy, na jakiej podstawie wnioskowano o prawidłowości obserwacji dotyczących poziomu ekspresji białek w komórkach? Autorka wspomina, że dokonano jedynie analizy jakościowej uzyskanych preparatów, jednak następnie interpretuje wyniki w świetle tej analizy np. w rozdziale Dyskusja na str. 87, Autorka pisze: „Prawdopodobnie spadki ekspresji xc- w obszarze CA1 hipokampa, sugerowane przez rezultaty barwienia immunofluorescencyjnego lepiej odzwierciedlają zmiany w tej strukturze u zwierząt, które otrzymywały CEF przed wywołaniem długotrwałego niedokrwienia, niż wyniki ELISA". Uważam, że porównanie ilościowych danych uzyskanych z testu ELISA z jednostkowymi obserwacjami wyników immunofluorescencji nie jest uprawnione bez wykonania analizy ilościowej sygnałów immunofluorescencyjnych.

3. Ponadto, ryciny 23-38 ilustrujące wyniki detekcji badanych białek korze ruchowej i hipokampie składają się z szeregu mikrofotografii wykonanych w dużym powiększeniu, co skutkuje tym, że czytelnik może porównać jedynie morfologię kilku komórek w polu widzenia. Nie jest dla mnie jasne czy zdjęcia obrazujące współwystępowanie sygnałów pochodzących od przeciwciał rozpoznających białka specyficzne dla różnych typów komórek tj. GFAP, IBA1, MAP2 oraz każdego białek będących przedmiotem badań (odpowiednio GLT-1 lub xc-) zostały wykonane dla tych samych struktur mózgu. Opisy rycin sugerują, że tak właśnie jest, jednak wzór ekspresji białka xc- w polu CA1 hipokampa zwierząt poddanych 90-minutowemu MCAO jest znacząco różny na rycinach obrazujących współbarwienie z GFAP, MAP2 i IBA1 (odpowiednio ryc. 30, 34 i 38). Zakładam, że jest to spowodowane wyborem pola widzenia właściwego dla współwystępowania odpowiednich białek. Jednak na tej postawie nie sposób ocenić poziom białka w całej strukturze (odpowiednio korze ruchowej

czy hipokampie). W ocenie faktycznego stanu rzeczy bardzo pomogłoby umieszczenie w pracy zdjęć wykonanych z użyciem obiektywu o mniejszym powiększeniu (z zaznaczeniem z którego obszaru pochodzą wybrane mikrofotografie) oraz uzupełnionych o barwienie jąder komórkowych, tak, żeby czytelnik mógł ocenić lokalizację sygnałów immunofluorescencyjnych w większym obszarze tkanki. Takie obrazy przedstawione dla kluczowych wyników, bo dla wszystkich wariantów barwień z uwagi na mnogość danych byłoby to oczywiście niemożliwe, pozwoliłyby na ocenę występowania badanych białek w odpowiednich strukturach mózgu.

4. Na rycinach dotyczących białka xc- pojawiają się również opisy xCT (w opisie rycin) i xc- lub Xc- (w opisie mikrofotografii). Czy to celowe rozróżnienie i z czego wynika?

5. Kilka rycin obrazujących poziom białka xc- błędnie opisano jako współwystępowanie białka GLT-1 i odpowiednich białek markerowych (ryc. 27, 28, 29, 30).

Dyskusja jest tradycyjnie ostatnim, przed wnioskami, rozdziałem rozprawy doktorskiej. Jest to dość obszerne opracowanie i wydaje mi się, że podzielenie wywodu na podrozdziały dotyczące interpretacji kluczowych wyników ułatwiłoby podążanie za tokiem rozumowania Autorki.

Wnioski są sformułowane jasno i uzasadnione w kontekście uzyskanych wyników. Poza syntetycznymi opisami uzyskanych wyników, za jakie uważam pierwszych 5 punków zaprezentowanych w tym rozdziale, znajdujemy dwa wnioski dotyczące najważniejszych odkryć dokonanych przez Doktorantkę, a więc stwierdzenia, że: 1. podanie każdego ze stosowanych modulatorów ekspresji transporterów glutaminianu poprzedzające właściwe ogniskowe niedokrwienie mózgu miało działanie ochronne oraz 2. badane transportery glutaminianu pełnią odmienna rolę w udarze niedokrwiennym – GLT-1 odgrywa rolę ochronną, zaś obecność xc- promuje dalszy rozwój uszkodzenia tkanki.

Pod względem formalnym praca jest przygotowana poprawnie. Z obowiązku recenzenta muszę zwrócić uwagę na obecność błędów redakcyjnych, których szczegółową listę przekazałam bezpośrednio Autorce rozprawy.

Podsumowując pragnę stwierdzić, że nieliczne uwagi krytyczne zawarte w niniejszej recenzji nie umniejszają mojej pozytywnej oceny rozprawy doktorskiej. Autorka wykazała się dobrym warsztatem badawczym oraz umiejętnością precyzyjnego przeprowadzenia badań i opracowania uzyskanych wyników. Tematyka pracy jest istotna z medycznego punktu widzenia, a przedstawione wyniki uzupełniają aktualną wiedzę na temat możliwości rozwoju tolerancji mózgu na niedokrwienie.

Stwierdzam zatem, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska „Modulacja transporterów układu glutaminergicznego przez ceftriakson i N-acetylocysteinę a rozwój tolerancji mózgu na niedokrwienie" spełnia warunki określone w art.13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. nr65. poz. 595 z późn. zm. i zwracam się do Wysokiej Rady Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum z wnioskiem o dopuszczenie mgr inż. Weroniki Krzyżanowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Małgorzata Zawadzka

dr hab. Małgorzata Zawadzka

prof. Instytutu Biologii Doświadczalnej PAN