

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr Emilii Kosonowskiej pt. "Zmiany struktury tkanki nerwowej wywołane ogólnoustrojowym stanem zapalnym jako korelaty podatności na napady drgawkowe".

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska mgr Emilii Kosonowskiej została wykonana w Zakładzie Neuroanatomii Instytutu Zoologii i Badań Biomedycznych Uniwersytetu Jagiellońskiego pod opieką dr hab. Zuzanny Setkowicz-Janeczko. Tematyka pracy dotyczy interesującego, a jednocześnie w niewielkim stopniu wyjaśnionego zagadnienia, jakim jest zależność pomiędzy indukowanym stanem zapalnym zaburzeniem postnatalnego rozwoju układu nerwowego a podatnością na napady padaczkowe w okresie dojrzałości. Wybór tematu rozprawy doktorskiej jest uzasadniony, ponieważ wyjaśnienie powyższej zależności może istotnie przyczynić się do zrozumienia neurobiologicznego podłoża i patomechanizmów padaczki, a w perspektywie do opracowania nowych, skuteczniejszych form zapobiegania i terapii tego schorzenia. Padaczka jest częstą, przewlekłą chorobą neurologiczną o tylko częściowo poznanej etiopatogenezie. Leczenie padaczki jest objawowe, a prawie 30% chorych jest oporna na farmakoterapię. Zważywszy na ogromną dynamikę zmian rozwojowych tkanki nerwowej oraz niemniej złożone mechanizmy molekularne stanu zapalnego, podjęte przez doktorantkę zadanie można uznać za niezwykle ambitne, pracochłonne, wymagające nie tylko gruntownego opanowania podstaw teoretycznych neuroanatomii i immunologii, ale także praktycznej znajomości wielu technik analitycznych. Zamieszczone na początku rozprawy podziękowania jasno dowodzą, że realizacja założeń badawczych wymagała umiejętności współpracy z innymi ekspertami.

Dysertacja ma typową konstrukcję i układ rozdziałów dla tego rodzaju opracowań, przy czym ryciny i zdjęcia mikroskopowe wraz z opisami doktorantka zdecydowała się umieścić w osobnej części. Dzieło liczy ogółem 136 stron, zawiera 8 przejrzyście opracowanych tabel, w tym 5 w rozdziale Materiały i Metody i 24 ryciny obejmujące schematy procedur doświadczalnych, zdjęcia z wybarwionymi immunohistochemicznie skrawkami mózgu oraz wykresy przedstawiające wyniki analiz ilościowych mierzonych parametrów. Ostatnia rycina jest ilustracyjnym podsumowaniem rozprawy i przedstawia możliwy mechanizm rozwoju tolerancji ośrodkowego układu nerwowego na umiarkowany stan zapalny. Wszystkie ryciny są czytelne i poprawnie opisane, a jakość zdjęć mikroskopowych jest także zadowalająca. Do rozprawy dołączono spis 256 pozycji numerowanego piśmiennictwa, ułożonego w porządku alfabetycznym. Wszystkie pozycje piśmiennictwa zostały właściwie wybrane, są reprezentatywne dla omawianych problemów i poprawnie cytowane w tekście rozprawy. Dużą liczbę cytowanych pozycji usprawiedliwia szeroki zakres wybranego obszaru badawczego. Rozprawa została starannie opracowana pod względem edytorskim. Wyróżnia ją płynna narracja i estetyczna szata graficzna.

Streszczenie (tylko w języku polskim), umieszczone na początku rozprawy, zawiera najwięcej informacji dotyczących uzasadnienia badań i komentarz do uzyskanych wyników. Mniej natomiast napisano na temat metodyki. Zdaniem recenzenta, oprócz wymienienia zastosowanych modeli badawczych, warto byłoby wspomnieć w tym rozdziale o różnorodnych technikach analitycznych tj. immunohistochemia, Western blott etc. Uwaga: na str. 4: jest wyrażenie: „Napady drgawkowe (SE)...”. Skrót SE odnosi się raczej do stanu padaczkowego (status epilepticus), o czym zresztą doktorantka pisze na dalszych stronach dysertacji.

Poprzedzony krótkim wprowadzeniem Wstęp liczy 27 stron i został logicznie podzielony na 5 podrozdziałów, z których dwa pierwsze dotyczą charakterystyki padaczki i jej modeli zwierzęcych, a w kolejnych zawarte są podstawowe informacje na temat patomechanizmów ogólnoustrojowego stanu zapalnego, jego modeli doświadczalnych i przesłanki dotyczące wpływu stanu zapalnego na

napady padaczkowe. Cały rozdział napisany jest przystępnym językiem, a prezentowane w nim poglądy autorki są oparte na właściwych materiałach źródłowych i odpowiadają współczesnemu stanowi wiedzy. Szczególnie interesująco doktorantka charakteryzuje rozwój stanu zapalnego w ośrodkowym układzie nerwowym i jego późniejsze konsekwencje w odniesieniu do zmian w pobudliwości neuronalnej. Wysoce kompetentnie przedstawiono współczesne poglądy na rolę stanów zapalnych we wczesnych okresach postnatalnych na wzrost odporności tkanki mózgowej na czynniki uszkodzające. Poruszając się w tak rozległych dziedzinach biologii i medycyny, doktorantka, siłą rzeczy, nie uniknęła pewnych uproszczeń i zbyt ogólnych uogólnień. Nieco nadmiernie rozbudowany jest podrozdział omawiający modele sepsy, nie związanych z celem rozprawy, który dotyczy umiarkowanych stanów zapalnych.

Drobne uwagi krytyczne:

1. Na str. 14 autorka pisze: „...leki pierwszej generacji takie jak pentobarbital czy kwas walproinowy...”. Powinno być: fenobarbital.
2. Poprawniej jest używać nazwy leki przeciwpadaczkowe niż antyepileptyczne (str. 14)
3. Str. 18: Komórki PV+ i ich funkcja powinny być dokładniej scharakteryzowane
4. Str. 24: Receptory TLR – brak rozwinięcia skrótu.

Założenia i cel pracy zostały dokładnie przedstawione na 3 stronach rozprawy, przy czym najwięcej miejsca przeznaczono na uzasadnienie podjętych badań i wybranych modeli doświadczalnych. Podkreślono, że głównym celem rozprawy jest ocena wpływu uogólnionego stanu zapalnego o umiarkowanej intensywności, wywołanego w dwóch różnych stadiach rozwoju postnatalnego na podatność na napady drgawkowe w wieku dojrzałym oraz na liczebność i morfologię komórek glejowych i nerwowych. Szczegółowe cele badawcze, odzwierciedlające kolejne etapy projektu, zostały jasno sformułowane w 4 punktach. W przypadku punktów 3 i 4, nasuwa się wątpliwość czy określenie „funkcjonalna ocena zmian tkanki nerwowej” jest adekwatna, ponieważ sugeruje użycie technik elektrofizjologicznych, natomiast wyniki analiz morfologicznych mogą tylko pośrednio świadczyć o zmianach funkcjonalnych.

Materiały i metody zostały rzetelnie opisane i uzupełnione pięcioma tabelami zawierającymi dane na temat liczebności grup, schematu procedur doświadczalnych, charakterystyki użytych przeciwciał, zasad oceny zmian behawioralnych oraz analiz morfologicznych. Warunki prowadzonych eksperymentów i bytowania zwierząt spełniały wymogi ustawowe, co było potwierdzone zgodą właściwej komisji etycznej. Doktorantka zastosowała szeroki wachlarz odpowiednio wybranych technik badawczych. Zastosowano model uogólnionego, umiarkowanego stanu zapalnego indukowanego niską dawką LPS, uznany zwierzęcy model padaczki skroniowej wywołany pilokarpiną, oraz behawioralną ocenę intensywności drgawek wg zmodyfikowanej skali Racine’a. Poprawnie także przeprowadzono barwienia immunohistochemiczne na obecność GFAP oraz Iba-1 będących znacznikami odpowiednio astrocytów i mikrogleju. Starannie opisano analizę Sholla, obejmującą pomiary kilku parametrów morfologicznych dla wyżej wspomnianych komórek oraz technikę zliczania komórek nerwowych wybarwionych na obecność parwalbuminy w formacji hipokampa i korze mózgowej. Oprócz badań immunohistochemicznych doktorantka zastosowała technikę ELISA do oznaczeń prozapalnych cytokin oraz Western blott do oceny zmian poziomu ekspresji GFAP, AQP4, GS oraz Kir4.1. Kryteria wyboru i opis analizy statystycznej, obejmującej jednoczynnikową ANOVA, test Kruskala-Wallisa oraz test Manna-Whitney’a nie budzą zastrzeżeń recenzenta.

Uwagi:

1. W jaki sposób kontrolowano specyficzność barwienia immunohistochemicznego?
2. Jaka była śmiertelność zwierząt po drgawkach indukowanych pilokarpiną?

3. Jak słusznie pisze doktorantka na str. 19 i 20, w modelu pilokarpinowym padaczki skroniowej obserwuje się zmiany neuropatologiczne głównie w hipokampie, ale także w innych obszarach mózgowia m.in. w korze śródwęchowej, wzgórzu i ciele migdałowatym. Czy zanotowano różnice w uszkodzeniach tych struktur u zwierząt, które oprócz pilokarpiny otrzymały wcześniej LPS? Czy oprócz ubytku interneuronów PV+ oceniano różnice międzygrupowe w stopniu uszkodzenia komórek piramidowych CA1 i CA3?
4. O ile celowość analizy zmian morfologicznych w formacji hipokampalnej nie budzi najmniejszych wątpliwości, to wybór kory przedczołowej powinien być lepiej uzasadniony ponieważ ten rejon nie jest szczególnie wrażliwy na uszkodzenia podrgawkowe. Niewiele danych też wskazuje, że kora przedczołowa jest częścią obwodów neuronalnych istotnych dla patomechanizmów padaczki skroniowej. Większe znaczenie przypisywano pętli neuronalnej : kora śródwęchowa – droga przeszywająca–formacja hipokampalna. Co zadecydowało o wyborze kory przedczołowej jako obszaru szczegółowej analizy ?
5. Ograniczeniem metodycznym niniejszej rozprawy jest ocena intensywności i czasu trwania drgawek wyłącznie na podstawie obserwacji zachowania zwierząt. Nie zawsze intensywność drgawek behawioralnych w takich modelach jak kwas kainowy czy pilokarpina ściśle korelują z późniejszymi zmianami neuropatologicznymi. Pomiary elektrofizjologiczne in vivo mogłyby dostarczyć dodatkowych, bardziej precyzyjnych danych.

Wyniki przeprowadzonych analiz opisano precyzyjnie na 14 stronach rozprawy. Ponadto na 20 dokładnie opisanych rycinach zaprezentowano zdjęcia preparatów mikroskopowych i wykresy obrazujące wyniki obserwacji behawioralnych, analiz immunohistochemicznych i morfologicznych a także analizy Western blott. Autorka wykazała, że przejściowy uogólniony stan zapalny u zwierząt 30 dniowych prowadził do wzrostu oporności na działanie drgawkogenne pilokarpiny u dorosłych osobników. Efekt ten wiązał się z mniejszym uszkodzeniem tkanki nerwowej i słabszą aktywacją komórek glejowych. U tych zwierząt obserwowano natomiast zwiększenie rozgałęzienia astrocytów oraz liczby ich wypustek co mogło zwiększyć ich własności buforujące, przyczyniając się do skuteczniejszego wygaszania napadów padaczkowych. Interesujący jest wynik wskazujący, że podanie LPS w 6 dniu życia nie hamowało intensywności napadów, lecz także chroniło tkankę nerwową przed uszkodzeniem. Analiza morfologiczna dowiodła, że w tym przypadku szlaki neuroprotektoryjne mogą być związane z komórkami mikrogleju, a brak efektu przeciwdrgawkowego można wiązać z mniejszą liczbą komórek parwalbumino-pozytywnych w hipokampie. Uzyskane wyniki są oryginalne i posiadają wysoką wartość merytoryczną. Niezaprzeczalnie stanowią istotny przyczynek do aktualnej wiedzy w zakresie wpływu stanów zapalnych we wczesnych okresach rozwoju układu nerwowego na podatność organizmu na występowanie napadów drgawkowych w okresie dojrzałości i wskazują na prawdopodobne mechanizmy tych złożonych procesów. Ponadto o merytorycznej wartości wyników rozprawy świadczy fakt, że większość z nich została już opublikowana w dwóch recenzowanych czasopismach międzynarodowych:

1. Setkowicz Z, Kosonowska E, Janeczko K.: Inflammation in the developing rat modulates astroglial reactivity to seizures in the mature brain. *J Anat.* 2017 Sep;231(3):366-379.
2. Kosonowska E, Janeczko K, Setkowicz Z.: Inflammation induced at different developmental stages affects differently the range of microglial reactivity and the course of seizures evoked in the adult rat. *Epilepsy Behav.* 2015 Aug;49:66-70.

Uwaga: W opisie Ryciny 10 B na str. 120 powinno być : „dwie osobne osie Y”, a nie X.

Dyskusja wyników została poprowadzona wysoce kompetentnie. Doktorantka swobodnie dyskutuje wyniki swych obserwacji na tle ustaleń innych grup badaczy, zachowując jednak krytycyzm

i godną pochwałą wstrzeźliwość w wyciąganiu zbyt daleko idących wniosków. Rozdział rozpoczyna przypomnienie najważniejszych rezultatów, po czym następuje wielostronna analiza indukowanych stanem zapalnym zmian liczebności i morfologii komórek nerwowych i glejowych. Ciekawa i przekonująca jest analiza zmian morfologicznych astrocytów oraz ekspresji kanałów potasowych Kir4.1 oraz akwaporyny AQP4. W tej części rozdziału doktorantka szerzej omówiła zaburzenia w sygnalizacji glutaminianergiczej między reaktywnymi astrocytami i neuronami, zakłócenia funkcji kanałów wodnych i potasowych oraz obniżenie aktywności syntetazy glutaminowej. Wspomniane dysfunkcje promują w formacji hipokampalnej ekscytotoksyczne uszkodzenie neuronów i nadpobudliwość lokalnych sieci neuronalnych, zatem nowe dane dotyczące modulującego wpływu stanu zapalnego na te procesy znacząco uzupełniają neuroimmunologiczną teorię padaczki. Zaskakująco dojrzała jest część dyskusji poświęcona znaczeniu zmian morfologicznych komórek mikrogleju (str. 80 - 82). Autorka zaznacza, że przejściowy uogólniony stan zapalny wywołuje długotrwale zmiany w morfologii komórek mikrogleju, przy czym występują różnice jakościowe w zależności od obszaru mózgu (zakręt zębany vs kora). Trudnymi interpretacyjnie okazały się wyniki analizy Sholla, nie zawsze pokrywające się z wynikami pomiarów innych parametrów aktywacji mikrogleju np. powierzchnią immunoreaktywną na obecność białka Iba-1. Rozbudowana i dogłębna jest dyskusja wyników dotyczących długotrwałego wpływu stanu zapalnego na liczbę interneuronów PV+ u zwierząt po przebyciu stanu padaczkowego. Wcześniej przebyty stan zapalny ograniczył indukowany drgawkami ubytek tych komórek, a zatem prawdopodobnie zmniejszył podatność tkanki nerwowej na powstawanie wyładowań padaczkowych. Szkoda, że autorka nie miała możliwości zbadać, czy oprócz zmian w intensywności i czasie trwania drgawek wywołanych pilokarpiną, wcześniejszy stan zapalny zapobiegał pojawianiu się napadów nieprovokowanych po 2 lub 3 tygodniach po przebyciu stanu padaczkowego. Taki pomiar pozwoliłby odpowiedzieć na pytanie czy LPS podany w 6 i 30 dniu życia istotnie wpływa na zaindukowaną drgawkami wtórną epileptogenezę. Dyskusję kończy syntetyczne opisanie indukowanych umiarkowanym stanem zapalnym możliwych mechanizmów rozwoju tolerancji tkanki nerwowej na czynniki uszkodzające (*preconditioning*). Podsumowanie i rozwinięte w 4 punktach wnioski końcowe są przejrzyste sformułowane i uzasadnione uzyskanymi przez doktorantkę wynikami. Wykaz skrótów został prawidłowo opracowany z uwzględnieniem nazw w języku polskim i angielskim. Drobną uwagę: str. 5: cklooksigenaza

Rozprawę doktorską mgr Emilii Kosonowskiej pt. "Zmiany struktury tkanki nerwowej wywołane ogólnoustrojowym stanem zapalnym jako korelaty podatności na napady drgawkowe" oceniam wysoce pozytywnie. Uznanie budzi ważna tematyka i rozbudowany, nowoczesny warsztat metodyczny. Pracochłonność przeprowadzonych eksperymentów oraz oryginalność i wysoka wartość merytoryczna uzyskanych wyników upoważniają mnie do wysunięcia wniosku o wyróżnienie rozprawy. Wymienione z obowiązku recenzenta nieliczne uwagi nie obniżają merytorycznej wartości rozprawy. Stwierdzam również, że rozprawa spełnia wymagania określone w Ustawie nr 595 o Stopniach Naukowych i Tytule Naukowym oraz Stopniach i Tytule w Zakresie Sztuki z dnia 14.03.2003 r. (wraz z późniejszymi zmianami). Wnioskuje o dopuszczenie mgr Emilię Kosonowską do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Kraków, 16.04.2018


prof. dr hab. Władysław Lasoń