

Katedra i Klinika Neurologii w Zabrze
Wydziału Lekarskiego z Oddziałem
Lekarsko-Dentystycznym w Zabrze
Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach
ul. 3 Maja 13-15 41-800 Zabrze

Zabrze, 05 czerwca 2018 roku

Recenzja pracy doktorskiej

Martyny Jastrzębskiej

„Interakcje pomiędzy astrocytami aktywowanymi osoczami pacjentów chorych na sporadyczną postać stwardnienia zanikowego bocznego a neuronami – badania *in vitro*”

napisanej pod kierunkiem dr hab. Piotra Pierzchalskiego jako promotora

i dr Pawła Link-Lenczowskiego jako promotora pomocniczego

Stwardnienie zanikowe boczne (ang. Amyotrophic Lateral Sclerosis - ALS) jest postępującą, przewlekłą, nieuleczalną chorobą neurodegeneracyjną, której istotą jest niepoznane etiologicznie uszkodzenie górnego i dolnego neuronu ruchowego. Obraz kliniczny charakteryzuje mieszany piramidowo-obwodowy niedowład i zanik mięśni, wynikający z pierwotnego uszkodzenia neurogennego. Typowo, chorym w początkowych stadiach choroby towarzyszą problemy z wykonywaniem czynności precyzyjnych, występują zaburzenia połykania, następnie dochodzi do uogólnionego zaniku mięśni, w tym mięśni oddechowych. Istnieje kilka postaci klinicznych, z czego najczęstsza postać klasyczna cechująca się typowo współistnieniem objawów opuszkowych i kończynowych, dotyczy około 70% wszystkich przypadków ALS. Rozpoznanie choroby opiera się na kryteriach El Escorial uwzględniając typowe objawy kliniczne oraz elektromiograficzne i elektroneurograficzne; przy dokładnym przeprowadzeniu diagnostyki różnicującej. Pomimo, intensyfikacji badań naukowych nad tą jednostką chorobową brak jest swoistego,

specyficznego biomarkera charakterystycznego dla ALS. Właściwe postawienie rozpoznania jest o tyle istotne, iż w niektórych schorzeniach obwodowego układu nerwowego, których objawy mogą imitować ALS możliwe jest zastosowanie skutecznej terapii.

Stwardnienie zanikowe boczne należy do chorób rzadkich, średnia częstość - 3/100 tys. osób na świecie, ale w ostatnich latach notuje się wzrost zachorowań na ALS, co być może wynika z lepszej dostępności do badań diagnostycznych. Ponieważ objawy choroby najczęściej pojawiają się po raz pierwszy u osób pomiędzy 50, a 60 rokiem życia stanowi to istotny społecznie problem diagnostyczno-terapeutyczny.

Wobec powyższego Doktorantka podjęła się bardzo ważnego problemu klinicznego. Celem pracy było ustalenie wpływu czynników zawartych w osoczu chorych na sporadyczny wariant stwardnienia zanikowego bocznego na aktywację komórek astrocytarnych oraz ustalenie, czy ta ewentualna zmiana aktywności komórek astrocytarnych wpływa na funkcjonowanie poddanych różnicowaniu neuronów. Podjęcie takiego tematu może wnieść istotny wkład w zagadnienia dotyczące etiopatogenezy tego nieuleczalnego schorzenia.

Przedłożona mi do oceny rozprawa liczy 132 strony i ma typowy układ pracy doktorskiej zawierający: wstęp, założenia i cele pracy, materiał i metody, wyniki, dyskusję, wnioski, streszczenie i piśmiennictwo. Pracę poprzedza bogaty wykaz skrótów, ułatwiający analizę tekstu. W pracy znajdują się 2 tabele oraz 25 autorskich czytelnych rycin.

We wstępie rozprawy zostały przedstawione wszystkie niezbędne, zgodne z najnowszymi doniesieniami, informacje dotyczące istoty ALS począwszy od objawów klinicznych i epidemiologii, poprzez etiopatogenezę do neuropatogenezy, uwzględniając mechanizmy wewnątrzkomórkowe. Skonstruowany w powyżej opisany sposób wstęp wprowadza czytelnika w zagadnienie i nawiązuje do przedstawionych w dalszej części rozprawy celów pracy.

Doktorantka sformułowała następujące cele badawcze:

1. Porównanie wpływu osocza zdrowego dawcy i osocza pacjentów chorych na sALS na aktywność enzymów proteolitycznych wydzielanych przez komórki astrocytarne.
2. Porównanie wpływu komórek astrocytarnych hodowanych uprzednio z osoczami zdrowego dawcy i pacjentów chorych na sALS na ekspresję receptorów dla neurotrofin na błonach komórkowych dwóch linii komórkowych nerwiaka płodowego.

3. Ustalenie czy dochodzi do ograniczonej proteolizy receptora NGFR w komórkach dwóch linii komórkowych nerwiaka płodowego.
4. Zaproponowanie mechanizmu molekularnego mogącego tłumaczyć charakter oddziaływań pomiędzy komórkami astrocytarnymi i neuronami w przebiegu sALS.

W rozdziale Materiał i Metody przedstawiono schemat badania oraz niezwykle dokładnie opisaną zastosowaną metodykę hodowli komórkowych i wykorzystanych technik biologii molekularnej z oceną ekspresji genów zarówno na poziomie mRNA, jak i białka. Na ogromne uznanie zasługuje plan przeprowadzonego badania na trzech liniach komórkowych oraz uwzględnienie tak dużej liczby ocenianych parametrów. Przeprowadzenie eksperymentów w ściśle kontrolowanych warunkach zewnętrznych *in vitro* pozwala na zapoznanie się w warunkach uproszczonych złożonych interakcji panujących w ośrodkowym układzie nerwowym pomiędzy astrocytami i innymi komórkami oraz umożliwia dokładną analizę zmian zachodzących na poziomie molekularnym w każdej z populacji komórkowych z osobna. Dobór zastosowanych metod statystycznych nie budzi wątpliwości.

Wyniki przedstawiono syntetycznie, w logicznym porządku, w tym również w postaci graficznej, ułatwiającej interpretację imponującej ilości danych. Na uwagę zasługuje fakt, iż na podstawie przeprowadzonego badania określono zmieniony profil wydzielniczy enzymów proteolitycznych wyrażony zwiększoną aktywnością MMP-9 w nadsączach hodowlanych komórek U373 MG, które miały kontakt z osoczem chorych na sALS. Ponadto, analiza ekspresji białka metodą mikromacierzy białkowych wykazała zwiększoną ekspresję dla GDNF, TNF-alfa, NT-3 oraz GTR, a także spadek ekspresji dla inhibitora metaloproteinaz TIMP-4 w tych komórkach.

Kolejną bardzo istotną informacją wynikającą z przeprowadzonej analizy jest fakt, że komórki linii SH-SY5Y oraz SK-N-BE(2)C wykazywały wzrost ekspresji mRNA dla NGFR w wyniku pośredniego kontaktu z osoczem chorych na sALS. Immunoblotting dla NGFR wykazał zjawisko ograniczonej proteolizy receptora dla NGF w obydwu liniach oraz translokacji jego części cytoplazmatycznej do jądra komórkowego. Analiza ekspresji białka dla NGFR ujawniła, że ograniczona proteoliza zachodzi niezależnie od aktywacji receptora NTRK1 w obu liniach komórkowych nerwiaka płodowego. Zebrane wyniki dotyczące ekspresji mRNA oraz białka receptorów dla NGF wskazują, że obydwie linie zareagowały odmiennie na proces różnicowania z zastosowaniem kwasu retinowego.

Dyskusja prowadzona jest bardzo ciekawie, w logiczny uporządkowany sposób. Doktorantka z dużą swobodą konfrontuje uzyskane wyniki z pracami innych autorów. Zaprezentowany sposób prowadzenia dyskusji i interpretacji własnych wyników świadczy o dojrzałości naukowej Autorki.

Rozprawa zawiera 176 bardzo dobrze dobranych pozycji piśmiennictwa, uwzględniających najnowsze doniesienia.

Wysunięte wnioski odpowiadają postawionym celom, jednakże nie są w pełni sformułowane zgodnie z postawionymi celami:

1. Ekspozycja komórek astrocytarnych na osocza pacjentów chorych na sALS prowadzi do wzrostu aktywności MMP-9 oraz spadku ekspresji TIMP-4, co może wskazywać na rearanżację w obrębie macierzy zewnątrzkomórkowej, co następnie może mieć wpływ na zmianę fizjologii pobliskich neuronów.
2. Ograniczona proteoliza receptora NGFR zachodzi w obydwu liniach komórkowych nerwiaka płodowego, co skutkuje translokacją domeny ICD receptora do jądra komórkowego.
3. Komórki linii SH-SY5Y, które miały kontakt pośredni z astrocytami hodowanymi z dodatkiem osoczy chorych na sALS wykazują mniejsze ilości fragmentu białka NGFR we frakcji jądrowej w trakcie blokowania NTRK1, co świadczy o istnieniu mechanizmu proteolizy NGFR zależnym od aktywacji NTRK1, co w odróżnieniu od komórek linii SK-N-BE(2)C w których w trakcie analogicznego eksperymentu ilość fragmentu białka NGFR wzrosła.
4. Komórki linii SH-SY5Y oraz SK-N-BE(2)C prawdopodobnie wykazują odmienne mechanizmy prowadzące do proteolizy białka NGFR. Wskazują na to obserwowane zmiany ilości fragmentów białek NGFR o masie mniejszej niż 75 kDa we frakcji jądrowej komórek SK-N-BE(2)C, hodowanych w nadsączach zbieranych uprzednio znad astrocytów hodowanych z dodatkiem osoczy chorych na sALS, w odróżnieniu od komórek linii SH-SY5Y, w których po zastosowaniu inhibitora dla NGFR nie odnotowano zmian ilości białka NGFR.

5. Osocza chorych na sALS są zdolne do reaktywacji komórek U373 MG, co wyraża się m.in. zmienionym wydzielaniem enzymów odpowiedzialnych za przebudowę macierzy zewnątrzkomórkowej. Rearanżacja środowiska zewnętrznego może być niekorzystnym sygnałem troficznym dla komórek nerwowych, prowadząc do zmienionej ekspresji receptorów błonowych dla neurotrofin (NTRK1 i NGFR) oraz ich ograniczonej proteolizy (NGFR). Zdarzenia te mogą następnie wpływać na przekaz sygnału do jądra komórkowego, a w efekcie zmianę ekspresji genów – kierując komórki na drogę śmierci komórkowej.

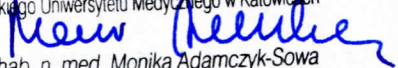
Pragnę podkreślić, że w wyniku przeprowadzonych eksperymentów uzyskano bardzo istotne dla etiopatogenezy ALS wyniki wskazujące, iż czynniki obecne w osoczach chorych na sporadyczny wariant ALS są zdolne do aktywacji astrocytów, manifestujące się wydzielaniem czynników neuroprotektoryjnych oraz powodujących uszkodzenie komórek nerwowych takich jak zwiększona aktywność enzymów proteolitycznych oraz spadek ekspresji inhibitorów metaloproteinaz. Co więcej, wartość pracy podnosi uzyskany wynik wzrostu aktywności komórek astrocytarnych wywołany obecnością czynników zawartych w osoczach chorych na sALS, co przyczynia się do zmian ekspresji, proteolizy oraz translokacji jądrowej białka NGFR, a w konsekwencji może prowadzić do zmienionej ekspresji genów i wywołanej ich działaniem śmierci komórki lub jej degeneracji.

Z obowiązku recenzenta zwróciłam uwagę na drobne błędy stylistyczne i interpunkcyjne, które w żaden sposób nie umniejszają rangi pracy, którą oceniam bardzo wysoko, a mają posłużyć jedynie jako wskazówka przed przygotowaniem pracy do opublikowania.

Z przyjemnością stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji dysertacja jest pracą wartościową naukowo, przeprowadzoną bardzo rzetelnie i potwierdza głęboką wiedzę Doktorantki na temat podjętego zagadnienia. Dotyczy obszaru wiedzy dotychczas nie w pełni poznanego, tematycznie bardzo istotnego dla światowej neurologii. Chciałabym podkreślić, iż uzyskane wyniki poza wartością naukową wnoszą szereg ważnych informacji istotnych dla praktyki klinicznej.

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa odpowiada wszelkim wymogom ustawowym jako podstawa do ubiegania się o stopień naukowy doktora. Upoważnia mnie to do wystąpienia do Wysokiej Rady Wydziału Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie z wnioskiem o dopuszczenie Pani Martyny Jastrzębskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Z pełnym przekonaniem mogę stwierdzić, że powyższa praca zasługuje na wyróżnienie.

KIEROWNIK
Katedry i Kliniki Neurologii
Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach

dr hab. n. med. Monika Adamczyk-Sowa