



Kraków, 28.05. 2018

Ocena

rozprawy doktorskiej mgr Martyny Jastrzębskiej pt. "Interakcje pomiędzy astrocytami aktywowanymi osoczami pacjentów chorych na sporadyczną postać stwardnienia zanikowego bocznego a neuronami – badania *in vitro*".

Stwardnienie zanikowe boczne (ALS) to choroba rzadka, której pierwsze objawy obserwuje się najczęściej u pacjentów pomiędzy 50 a 60 rokiem życia, a o jej rozpoznaniu decyduje postępująca dysfunkcja oraz degeneracja dolnego oraz górnego neuronu motorycznego, co prowadzi do odnerwienia mięśni efektorowych i w konsekwencji do paraliżu. Choroba ta u około 5-10% przypadków ma charakter dziedziczny, natomiast pozostała większość zachorowań ma postać spontaniczną. Jej przebieg jest dramatyczny i prowadzi do śmierci, średnio od 3 do 5 lat od momentu wystąpienia pierwszych objawów. Niejednorodny obraz kliniczny oraz brak dostatecznej znajomości etiologii oraz patogenezы stwardnienia zanikowego bocznego powodują, że farmakoterapia tego schorzenia jest znikoma i pozwala jedynie przedłużyć okres przeżycia pacjentów o kilka miesięcy. Dlatego biorąc pod uwagę powyższe fakty, moim zdaniem wybór tematyki rozprawy doktorskiej mgr Martyny Jastrzębskiej jest w pełni uzasadniony i stanowić może niezwykle cenny wkład w poznanie patomechanizmów sporadycznej postaci ALS poprzez ocenę roli astrocytów i ich interakcji z komórkami neuronalnymi w patogenezie tego schorzenia. Jednocześnie ograniczona jak dotychczas literatura traktująca o tych zagadnieniach wskazuje na nowatorski charakter badań podjętych w rozprawie.

Praca doktorska napisana została zgodnie z ogólnie przyjętymi zasadami, składa się na nią 106 stron maszynopisu - podzielonego na rozdziały i podrozdziały, 25 rycin oraz 2 tabele. Na końcu rozprawy dołączono zgodę Komisji Bioetycznej UJ na przeprowadzenie opisanych w rozprawie badań, natomiast na jej początku spis skrótów z ich dwujęzycznym wyjaśnieniem, co zdaniem recenzenta ułatwia znacząco lekturę pracy.

Wstęp pracy liczy 21 stron. Autorka przedstawiła w nim krótką historię badań, obraz kliniczny oraz kryteriach rozpoznawania ALS by następnie przejść do epidemiologii tego schorzenia. W tej części mgr Jastrzębska mocno akcentuje, że jak dotychczas nie ma żadnej

skutecznej farmakoterapii ALS, a stosowany obecnie Riluzol przedłuża jedynie nieznacznie przeżycie pacjentów. Na kolejnych stronach rozprawy Autorka w oparciu o dobrze dobrane piśmiennictwo, przedstawiła dotychczasowe hipotezy dotyczące podłoża rozwoju ALS. Tym niemniej opisana w pracy rola zmian genetycznych, jest moim zdaniem zbyt obszerna, zwłaszcza, że odbiega od głównego nurtu rozprawy. Cenne są natomiast dane wskazujące na potencjalną rolę aktywowanych astrocytów w mechanizmach indukcji ALS. Oprócz udziału tych komórek w zjawiskach ekscytotoksyczności Autorka dużo uwagi poświęca uwalnianym przez astrocyty czynnikom neurotroficznym, które odgrywają ważną rolę w prawidłowym różnicowaniu, przeżyciu neuronów oraz zjawiskach związanych z plastycznością. Pewien mój niedosyt budzi brak w tej części rozprawy informacji dotyczących insulino-podobnych-czynników wzrostu (w tym IGF-1), który nie tylko balansuje indukowane przez cytokiny pro-zapalne procesy zapalne w mózgu, ale także kontroluje aktywność mikrogleju oraz jego interakcje zarówno z neuronami jak i astrocytami (w tym aktywowanymi). We *Wstępie* Autorka swoją uwagę skupiła natomiast prawie wyłącznie na czynniku NGF i jego receptorach (NGFR, NTRK1), a także zjawiskach proteolizy zachodzącej pod wpływem zmian strukturalnych wewnątrz cząsteczki tych receptorów. Zapoznając się z opisem budowy receptorów NTRK1 znalazłam pewne niedociągnięcia np. nie wspomniano o części transbłonowej tego receptora. W tej części rozprawy Autorka pisze: „że w miarę dojrzewania układu nerwowego ekspresja NGFR i NTRK1 jest stopniowo coraz niższa aż do całkowitego zaniku po osiągnięciu przez neurony całkowitej dojrzałości funkcjonalnej” czy i jak zatem wygląda ekspresja NTRK1 w dorosłym mózgu zarówno w warunkach podstawowych jak i w stanach patologicznych – proszę o wyjaśnienie?

W drugiej części *Wstępu* przeprowadzono analizę modeli *in vitro* jako nowego narzędzia do badań patomechanizmów ALS, które stanowić może alternatywę dla doświadczeń prowadzonych na materiale biopsyjnym lub z wykorzystaniem modeli transgenicznych (tylko wariant rodzinny ALS). Autorka pisze o potencjalnym zastosowaniu modeli *in vitro* do badań sALS wymieniając wśród nich między innymi hodowle komórek macierzystych oraz hodowle organotypowe rdzenia kręgowego. Ostatnie strony rozdziału *Wstęp* wprowadzają czytelnika w model badawczy, który Pani Jastrzębska postanowiła wybrać do realizacji celów rozprawy, przedstawiając jego zalety, ale także i ograniczenia w porównaniu z innymi modelami opisanymi na wcześniejszych stronach rozprawy. Model ten oparto o wykorzystanie trzech linii komórkowych: nerwiaka płodowego (neuroblastomy) SH-SY-5Y i SK-N-BE(2)C różnicowanych kwasem retinowym oraz gwiazdki (astrocytomy) U373 MG.

Cel pracy i jej założenia są prawidłowe, a skupiają się na porównawczej analizie wpływu osocza zdrowego dawcy oraz osocza pacjentów chorych na sporadyczną postać ALS na aktywację komórek astrocytarnych, a następnie na ocenie czy proces ten może

modulować funkcjonowanie komórek neuroblastomy poddanych różnicowaniu. Obrany cel mgr Jastrzębska realizowała w kilku dobrze przemyślanych i spójnych etapach badawczych.

Przedstawiony przez Autorkę w rozdziale *Materiał i metody* opis procedur badawczych jest prawidłowy, uzupełniają go przejrzyste schematy: doświadczeń (ryc. 1) oraz oznaczania i analizy białek metodą mikromacierzy komórkowych (ryc. 2). W rozdziale tym podobnie jak w całej rozprawie nie znalazłam jednak informacji dotyczących zastosowanych przez mgr Jastrzębską metod statystycznych służących do analizy uzyskanych wyników, a stosowane przez Autorkę określenia „ekspresja nieco wzrastała czy wyraźnie wzrastała” nie są moim zdaniem kanonem w rozprawach doktorskich. W całej pracy brak jest także informacji czy i z ilu niezależnych hodowli uzyskano prezentowane wyniki, jaka jest liczebność wyników w poszczególnych grupach badawczych (n). Dlaczego w doświadczeniach wykorzystano tylko jedno osocze od dawcy kontrolnego, przy wykorzystaniu większej ich liczby od pacjentów z sALS i czy działanie takie zdaniem Autorki uprawnia do analiz porównawczych i statystycznych uzyskanych wyników?

Generalnie opisane w pracy przez Panią mgr Jastrzębską wyniki są ciekawe, spójne oraz wzbogacone ilustracjami graficznymi. Przedstawiony schemat przeprowadzonych doświadczeń świadczy o wytrwałości badawczej Autorki w testowaniu modeli komórkowych odzwierciedlających interakcje pomiędzy astrocytami oraz neuronami na poziomie molekularnym w odpowiedzi na osocza pacjentów chorych na sALS, a z drugiej strony o jej obiektywnej ocenie napotykanych trudności i ograniczeniach, co niewątpliwie warto podkreślić. Po analizie tej części rozprawy mam kilka pytań oraz uwag:

- jaki był schemat stymulacji komórek U373 MG cytokinami, czy były to osobne doświadczenia dla każdej z wymienionych cytokin, czy stosowano je w kombinacjach (w badaniach niezamieszczonych w pracy); jaki był cel wykorzystania w tych badaniach cytokiny przeciw-zapalnej IL-10,

- jakie przesłanki zadecydowały o zastosowaniu łącznym (IL-1 β + IL-6) do stymulacji ekspresji metaloproteinaz oraz oceny aktywności ich inhibitorów tkankowych w komórkach U373 MG, a nie jak raczej sugerują dane literaturowe zaprezentowane w dyskusji (IL-1 β i/lub TNF- α ; str.86),

- jak interpretować można brak wpływu osocza pacjentów chorych na sALS, na tkankowy poziom MMP-9 (ryc. 8) w porównaniu z zastosowaniem cytokin (IL-1 β + IL-6), biorąc pod uwagę fakt, iż profil ekspresyjny białek w komórkach U373 MG pod wpływem osocza pacjentów sALS wykazał istotny wzrost ekspresji TNF- α (ryc. 24),

- na ryc. 10 pod wykresami w części C brak jest pełnej nazwy zastosowanej linii komórkowej SK-N-BE(2)C,

- ryc. 12 brak danych dotyczących analizy ekspresji NGFR i GAPDH w komórkach SK-N-BE(2)C czyli zgodnie z podpisem pod ryciną, części B wykresu,

- jaka była przesłanka zastosowania do oznaczeń NGFR wycofanego przez firmę poliklonalnego przeciwciała przeciwko N-końcowemu fragmentowi tego białka,

- na ryc. 15 oraz na ryc. 16 nie znalazłam immunoblotów przedstawiających analizę ekspresji NGFR odpowiednio we frakcji cytozolowej oraz jądrowej komórek SK-N-BE(2)C przed podaniem inhibitora, chociaż informacje takie zamieszczono w podpisie pod rycinami (np. BK, B+UK). I jeszcze moja sugestia, uważam że wyniki zamieszczone w podrozdziale 4.9 powinny się znaleźć w bezpośrednim sąsiedztwie podrozdziału 4.3 gdyż przedstawione w nich dane dostarczają informacji dotyczących wpływu osocza pacjentów kontrolnych oraz chorych na sALS na komórki astrocytarne U373 MG.

Interpretację uzyskanych wyników mgr Jastrzębska przeprowadziła w oparciu o dostępne piśmiennictwo w liczącej 18 stron wydruku komputerowego *Dyskusji* i chociaż niektóre z jej partii przypominają opis uzyskanych wyników zamieszczonych w rozdziale wcześniejszym sposób jej napisania świadczy o dobrej znajomości tematu przez Autorkę. Na podkreślenie zasługuje fakt, iż ta część rozprawy, podobnie zresztą jak jej całość, napisana została bardzo starannie, a błędy stylistyczne czy językowe są nieliczne. Jej konstrukcja jest przemyślana i prowadzona poprawnie, co świadczy o dojrzałości naukowej Autorki. Atutem *Dyskusji* jest zamieszczony w jej końcowym fragmencie szczegółowy opis wraz z ilustracją (ryc. 25) w którym podjęto próbę wyjaśnienia molekularnych mechanizmów interakcji zachodzących pomiędzy aktywowanymi osoczami pacjentów cierpiących na sALS, a komórkami neuroblastomy poddanej procesowi różnicowania z użyciem kwasu retinowego. Propozycja ta chociaż na pewno wymaga dalszych badań i weryfikacji stanowi interesujące podsumowanie rozprawy.

W końcowej części rozprawy zamieszczono *Wnioski* które, są słuszne i całkowicie poparte uzyskanymi w pracy wynikami. Pracę doktorską kończy streszczenie w języku polskim i angielskim oraz wykaz 176 pozycji piśmiennictwa.

W podsumowaniu stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska mgr Martyny Jastrzębskiej jest pionierska pod względem metodycznym i daje możliwość nowego spojrzenia na zastosowanie modeli *in vitro* do badań patomechanizmów sporadycznej postaci ALS. Uzyskane wyniki są interesujące i wskazują, że obecne w osoczu pacjentów chorych na sALS czynniki zachowują zdolność aktywacji komórek astrocytarnych, a proces ten jest złożony i prowadzi do wydzielania czynników zarówno o potencjale neuroprotektynym jak i neurotoksycznym. Aktywacja astrocytów może zatem stanowić interesujący target do dalszych badań patomechanizmów sALS oraz potencjalnej farmakoterapii tego schorzenia. Jednocześnie pragnę stwierdzić, że wszystkie poczynione z obowiązku recenzenta uwagi nie podważają wartości merytorycznej rozprawy.

Dlatego uważam, że oceniana praca pt. "Interakcje pomiędzy astrocytami aktywowanymi osoczami pacjentów chorych na sporadyczną postać stwardnienia zanikowego bocznego a neuronami – badania *in vitro*" spełnia warunki określone w art. 13 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki i wnioskuję z pełnym przekonaniem o dopuszczeniu mgr Martyny Jastrzębskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Kierownik Pracowni
Immunoendokrynologii

Prof. dr hab. Agnieszka Basta-Kaim

Prof. dr hab. n. med. Agnieszka Basta-Kaim