



KATEDRA I ZAKŁAD PATOFIZJOLOGII

UNIwersytetu Medycznego w Lublinie

ul. Jaczewskiego 8b, 20-090 Lublin

tel.: +48-81-448-65-00

fax: +48-81-448-65-01

kierownik: prof. zw. dr hab. n. med. Stanisław J. Czuczwar
(stanislaw.czuczwar@pan.pl)

Recenzja pracy doktorskiej „Zmiany strukturalne i funkcjonalne w zwierzęcym modelu niedorozwoju mózgu” wykonanej przez mgr. Michała Kielbińskiego pod kierunkiem prof. Krzysztofa Janeczko na Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Jagiellońskiego

Lekooporne napady padaczkowe dotyczą ok. 30% pacjentów z tą poważną chorobą neurologiczną. Początkowo wydawało się, że nowsze leki przeciwpadaczkowe, wchodzące do terapii u schyłku XX wieku, przynajmniej częściowo rozwiążą ten problem. Jednakże poza lepszymi własnościami farmakokinetycznymi oraz słabszymi efektami niepożądanymi, leki te nie ograniczyły istotnie odsetka pacjentów z tego rodzajem napadów. Wiąże się to z jednej strony z poszukiwaniem alternatywnych metod leczenia, jak zabiegi chirurgiczne, czy głęboka stymulacja mózgu, jednak nie zawsze metody te (szczególnie pierwsza) są możliwe do zastosowania i nie zawsze wywołują oczekiwany skutek. Dlatego też poszukuje się obecnie z użyciem modeli zwierzęcych metod terapeutycznych modulujących przebieg epileptogenezy, czyli np. leków przyczynowych w przeciwieństwie do leków przeciwpadaczkowych, które są typowymi lekami objawowymi. Doktorant słusznie zauważa, że badane przez Niego malformacje rozwojowe są istotną przyczyną pojawiania się

padaczkowych napadów lekoopornych u dzieci a poznanie mechanizmów epileptogenezy, towarzyszących malformacjom, może się przyczynić do powstania wyżej wspomnianych leków przyczynowych. Cel badań jest więc jak najbardziej uzasadniony – w zasadzie powinienem użyć sformułowania: cele badań, gdyż ich liczba jest imponująca i zasługuje na szczególne podkreślenie. Doktorant postawił sobie za cel szczegółowe zbadanie zmian anatomicznych w mózgach napromienianych prenatalnie szczurów (w czterech różnych okresach życia płodowego), scharakteryzowanie aktywności EEG oraz zmian w astrocytach w tych grupach. Kolejnym celem było zbadanie towarzyszących zmian w ekspresji genów w hipokampie, przy czym ten cel został rozszerzony na grupy zwierząt, u których wywoływano aktywność drgawkową za pomocą pilokarpiny, bądź powtarzanych elektrowstrząsów.

Rozprawa ma układ typowy i liczy 116 stron wydruku komputerowego oraz zawiera 16 rycin i 6 tabel. Lista referencji obejmuje 243 publikacje, w zdecydowanej większości już z XXI wieku. Uwagę zwraca publikacja z lat 70-tych, pojedyncze prace z lat 80-tych i kilka z lat 90-tych poprzedniego stulecia, co świadczy o szerokim spojrzeniu Doktoranta na badane problemy. We Wstępie (na ponad 30 stronach wydruku) Doktorant wyczerpująco przedstawia typy oraz klasyfikacje malformacji a następnie przechodzi do omówienia zależności pomiędzy padaczką lekooporną a różnymi typami dysplazji. Zwraca uwagę na fakt, że główną metodą leczenia napadów u pacjentów z dysplazjami są zabiegi chirurgiczne, co zdecydowanie odróżnia tę grupę od przypadków padaczki lekoopornej, wynikających z odmiennej etiologii. Kolejne strony dotyczą mechanizmów dysplazji – w ramach tego problemu dyskutowane są także mechanizmy epileptogenezy zachodzące w trakcie dysplazji. Mgr Kielbiński rozważa zmiany na poziomie neuroprzeżywalności pobudzającego i hamującego oraz na poziomie mechanizmów genetycznych. Analizuje również wpływ, jaki może wywierać dysplastyczna kora mózgowa na obszary kory prawidłowej poprzez wywoływanie stanu zapalnego ze wszystkimi jego konsekwencjami w procesie inicjowania

epileptogenezy. Zwraca uwagę na istotną rolę gleju w tymże procesie. Kolejne części Wstępu zostały poświęcone modelom zaburzeń rozwojowych mózgu, poprzedzone dokładnym opisem faz rozwoju kresomózgowia. Poddaje także analizie zmiany progu drgawkowego u szczurów pod wpływem różnych okresów stosowania napromienienia. Co ciekawe, obserwowano różnice tak w odniesieniu do czasu życia płodowego w momencie napromienienia, jak i w odniesieniu do stosowanych substancji drgawkotwórczych. Bardzo ważne jest nawiązanie Doktoranta do ograniczeń, jakie niosą modele zwierzęce. Analizując, na zakończenie Wstępu, przesłanki badawcze rozprawy, Doktorant zwrócił uwagę na istotny aspekt, iż większość badań z użyciem napromienienia prenatalnego odnosi się do 17 dnia życia płodowego, dlatego też przyjęcie czterech różnych punktów czasowych (ekspozycja w 13, 15, 17 i 19 dniu życia) dodatkowo poszerza wiedzę na temat badanych procesów i umożliwia śledzenie ewentualnych korelacji czasowych.

Materiał i metody zostały prawidłowo przedstawione na niespełna 18 stronach wydruku. Mgr Kielbiński dokładnie opisuje przebieg procedur napromieniania oraz przygotowanie zwierząt do doświadczeń oraz ich podział na grupy doświadczalne, co znacznie ułatwia zrozumienie przedstawianych wyników. Kolejno omawiane są implantacje urządzeń telemetrycznych do rejestracji sygnału EEG oraz sposób analizy tego sygnału a także metody MRI, immunohistochemii oraz „Western blotting”. Wreszcie Doktorant przedstawił metody pomiaru ekspresji genów oraz wywoływane procedury drgawkowe za pomocą pilokarpiny i wielokrotnej stymulacji elektrycznej. W trakcie omawiania stosowanych metod zostały zaprezentowane stosowane metody analizy statystycznej.

Wyniki obejmują 19 stron wydruku i są ilustrowane rycinami (także w formie zdjęć) oraz tabelami. Generalnie, Doktorant obserwował zmniejszenie objętości mózgu, które było wyraźnie zależne od dnia życia płodowego, w którym nastąpiło napromienienie, poczynając od największego spadku objętości w dniu 13-tym ekspozycji. Kolejne ekspozycje

charakteryzowały się mniejszymi spadkami objętości. Podobnie, najsilniej wyrażone zmiany dysplastyczne były największe w 13 i 15 dniu ekspozycji. Co ciekawe, w dniu 17-tym zmiany były łagodniejsze ale dotyczyły większego odsetka zwierząt. W odniesieniu do profili spektralnych EEG, największe zmiany obserwowano u zwierząt eksponowanych na promieniowanie gamma w 15 dniu życia płodowego i nie korelowały one ze stopniem heterotopii oraz redukcją objętości mózgu. Z kolei zmniejszona reaktywność na marker astrocytarny GFAP była szczególnie wyraźna przy ekspozycji w dniu 19-tym. Ta sama zależność dotyczyła białek powiązanych z astrocytami. Zmiany w ekspresji genów dotyczyły ich w liczbie 22, przy czym ich największe nasilenie obserwowano u zwierząt po wcześniejszych ekspozycjach na promieniowanie. Podanie pilokarpiny i wywołana przez nią aktywność drgawkowa w odległym okresie powodowała efekt addytywny w odniesieniu do zmian ekspresji genów wywołanych napromienieniem. Powtarzane elektrowstrząsy były pod tym względem znacznie mniej efektywne.

Dyskusja (na blisko 13 stronach wydruku) jest z jednej strony obszerna a z drugiej – twórcza i inspirująca. Przede wszystkim mgr Kielbiński przedyskutował wszystkie otrzymane wyniki a było ich niemało. Doktoranta szczególnie zainteresował fakt zmian spektralnych w EEG, które nie korelowały z intensywnością zmian anatomicznych, które były najsilniej wyrażone w grupie eksponowanej na promieniowanie w 13-tym dniu życia płodowego. Praktycznie grupa ta nie wykazywała zmian w profilu EEG w porównaniu do grupy kontrolnej. W szczegółowych rozważaniach zmierzających do wyjaśnienia tego fenomenu Doktorant proponuje prawdopodobny udział interneuronów parwalbuminowych i/lub mechanizm astrocytarny. W dyskusji na bazie analizy funkcjonalnej *in silico* a także na podstawie danych z piśmiennictwa na temat znaczenia genów oraz zmian ich ekspresji, Doktorant zaproponował szereg procesów, układających się w logiczny ciąg, prowadzący na bazie zmian dysplastycznych do zaburzeń w szlakach molekularnych odpowiedzialnych za

rozwój mózgu, określenie fenotypów komórkowych, nadzór nad procesami zapalnymi i wreszcie reakcją na czynniki uszkodzające. Moim zdaniem, wyniki uzyskane w niniejszej rozprawie, mogą przyczynić się do poznania mechanizmów epileptogenezy a tym samym do określenia możliwości jej hamowania, szczególnie w odniesieniu do zmian dysplastycznych u dzieci.

Po przeczytaniu tej interesującej rozprawy nasunęły mi się następujące komentarze i uwagi:

1. Na stronie 18-tej lepiej brzmiałoby „przedwczesny poród” zamiast „przedwczesne urodzenie”
2. Sformułowanie „białka odporności lekowej” powinno być zastąpione „białkami odporności lekowej” (str. 24)
3. Str. 38 i następne: pilokarpina i kwas kainowy są typowymi substancjami drgawkotwórczymi a nie „prodrgawkowymi”. W moim odczuciu substancja prodrgawkowa obniża próg drgawkowy nie wywołując aktywności drgawkowej
4. Mimo wszystko umieściłbym inicjały autorów pozycji piśmiennictwa umieszczonych w bibliografii. W odniesieniu do niektórych pozycji piśmiennictwa Doktorant umieścił pełne imiona pierwszych autorów (poz. 61,123-126, 134,145,146), co sprawia wrażenie, szczególnie w przypadku autorów z krajów azjatyckich, braku stosowania kolejności alfabetycznej
5. Do dyskusji włączyłbym wyniki Nemes i wsp. (Epilepsia, 2017;58:1755-1761) dotyczące wpływu leków przeciwpadaczkowych na aktywność drgawkową wywołaną pentylenetetrazolem u szczurów z dysplazją korową. Warto też byłoby wspomnieć o wpływie dysplazji korowej na skutki pourazowego uszkodzenia mózgu (Nemes i wsp., J Neurotrauma 2016;33:1883-1891).

6. Brakuje mi przedstawienia bardziej szczegółowych danych odnośnie wywoływanej aktywności drgawkowej. Zgadzam się jednocześnie, że podane kryteria graniczne oceny tejże aktywności, decydujące o selekcji zwierząt do dalszych doświadczeń, są wystarczające pod kątem tej rozprawy.

Przedstawione powyżej uwagi nie wpływają na wysoką zawartość merytoryczną przedstawionej mi do oceny rozprawy doktorskiej mgr. Kielbińskiego. Fakt opublikowania znaczącej części wyników w prestiżowych czasopismach naukowych, z Doktorantem jako pierwszym autorem, dodatkowo świadczy o ich oryginalności i wysokim poziomie realizacji. Mgr M. Kielbiński pod kierunkiem prof. K. Janeczko wykonał wszystkie zakładane w celach rozprawy doświadczenia i ich wyniki poddał gruntownej analizie, sugerując, iż stosowany przez Niego model dysplazji mózgu może służyć do poznawania ciągle jeszcze niedostatecznie rozwikłanego mechanizmu epileptogenezy. Podczas realizacji badań stosowano nowoczesne metody, m.in. biologii molekularnej, które pozwalają na głębokie wniknięcie w poznanie toczących się procesów patologicznych w mózgu. Biorąc pod uwagę wspomniany wysoki poziom merytoryczny rozprawy, staranne przygotowanie wszystkich rozdziałów oraz ogrom włożonej pracy (tak na poziomie doświadczalnym, jak i redakcji rozprawy) zwracam się do Wysokiej Rady Wydziału Biologii Uniwersytetu Jagiellońskiego z wnioskiem nie tylko dopuszczenia Doktoranta do dalszych etapów przewodu doktorskiego, ale też z pełnym przekonaniem wnioskuję o przyznanie wyróżnienia tej wartościowej rozprawie.

KIELBIŃSKI
Krzysztof
mgr
Prof. dr hab. Janeczko i dr Janeczko

WICEPREZES
Polskiej Akademii Nauk
Stanisław J. Czuczwar

Lublin, 2018-05-08