

Dr hab. n. med. Elżbieta Salińska
Zakład Neurochemii
IMDiK PAN
02-106 Warszawa, Pawińskiego 5

Warszawa, 11 grudnia 2017 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej

Mgr Joanny Rzemieniec

pt. „Neuroprotekcynny potencjał raloksifenu i 3, 3'-diindolometanu w modelu hipoksji: badania na komórkach nerwowych myszy w hodowlach pierwotnych in vitro”.

Niedotlenienie mózgu towarzyszy wielu chorobom, w tym chorobom takim jak udary, których częstotliwość występowania związana jest z rozwojem cywilizacji, czy chorobom, z którymi mimo rozwoju tej cywilizacji nie potrafimy sobie poradzić, takimi jak niedotlenienie okołoporodowe. Stosowane obecnie metody leczenia, mające zapobiegać uszkodzeniom mózgu spowodowanym przez niedotlenienie, są nieliczne, a przy tym mało skuteczne. Dlatego liczna rzesza naukowców poszukuje nowych terapii i leków, dających nadzieję na zmniejszenie skutków niedotlenienia i poprawę stanu chorych. Niezbędnym elementem takich poszukiwań jest lepsze zrozumienie molekularnych mechanizmów prowadzących do uszkodzenia neuronów, co umożliwia wytypowanie punktów uchwytu dla nowej terapii.

Wśród wielu proponowanych przez badaczy potencjalnych celów, dużym potencjałem terapeutycznym wyróżniają się receptory estrogenów. Aktywacja tych receptorów w warunkach niedokrwienia/niedotlenienia skutkuje neuroprotekcją tkanki nerwowej. Jednakże pomimo udokumentowanego działania anty-apoptotycznego, przeciwzapalnego oraz przeciwtleniającego, dłuższe stosowania estrogenów nie jest zalecane ze względu na niepożądane skutki uboczne.

Przedstawiona do recenzji praca doktorska włącza się w nurt poszukiwań skutecznych terapii niedotlenienia mózgu, nie rezygnując z dotychczasowych osiągnięć nauki. Pomysł zastąpienia klasycznych agonistów receptorów estrogenowych selektywnymi modulatorami tych receptorów oraz włączenie do badań selektywnego modulatora receptorów węglowodorów aromatycznych, wchodzących w interakcje z receptorami estrogenów, jest interesujący i - jak widać z przedstawionej rozprawy - przyniósł ciekawe wyniki. Przeprowadzone przez doktorantkę badania molekularnych mechanizmów neuroprotekcynnego działania tych związków zdecydowanie poszerzają wiedzę na ten temat i mogą ułatwić przyszłe decyzje odnośnie ich klinicznego zastosowania w terapii chorób niedokrwienno-niedotlenieniowych mózgu.

Przedstawiona rozprawa doktorska jest skonstruowana w formie spinki opublikowanych prac, z dołączonym obszernym wstępem, skondensowanym opisem metod i wyników oraz rozwiniętą dyskusją. Mgr Rzemieniec do spinki wybrała trzy z jedenastu prac, w których jest jednym z autorów. W pracach wchodzących w skład rozprawy, opublikowanych w czasopiśmie z wysokim Impact Factor, doktorantka jest pierwszym autorem, a oświadczenia współautorów tych prac oraz samej doktorantki, wskazują na duży wkład merytoryczny oraz wykonawczy mgr Rzemieniec w ich powstanie.

Wstęp wprowadza czytelnika w temat rozprawy, podając informacje dotyczące obecnej wiedzy w zakresie patofizjologii niedotlenienia mózgu, a także wiedzy o receptorach estrogenów (ER) i receptorach węglowodorów aromatycznych (AhR) oraz potencjale neuroprotekcijnym ich modulacji. Doktorantka wskazuje również na konieczność zastosowania selektywnych modulatorów tych receptorów w prowadzeniu badań nad neuroprotekcją, uzasadniając ich przewagę nad endogennymi agonistami. Do badań wybrano raloksifen – modulator receptorów estrogenów oraz 3,3'-diindolometan (DIM) – modulator receptorów węglowodorów aromatycznych. Ze wstępu dowiadujemy się także o neuroprotekcijnym działaniu pobudzonych receptorów aktywowanych przez proliferatory peroksydomów typu gamma (PPAR- γ) i ich interakcji z receptorami estrogenów, co optuje za włączeniem do tego badania określenia ich udziału w neuroprotekcynnej odpowiedzi na wybrany selektywny modulator receptorów estrogenowych po niedotlenieniu. Ta część pracy doktorskiej generalnie mi się podoba i jest świadectwem bardzo dobrej orientacji doktorantki w zagadnieniach będących przedmiotem rozprawy, jednak mam do niej kilka uwag.

Selektywne modulatory receptorów estrogenowych i węglowodorów aromatycznych działają różnie w zależności od tkanki, zachowując się jak agonista lub antagonist. Autorka zamieściła w tekście informacje jak opisywane związki działają w tkance kostnej, gruczole piersiowym czy przydatkach. Nie ma jednak informacji jak zachowują się w tkance nerwowej i dopiero lektura dołączonych odbitek wyjaśnia sprawę. Zabrakło również informacji, że DIM, oprócz receptorów węglowodorów aromatycznych, działa też bezpośrednio na receptory estrogenów oraz NF- κ B.

Trudno mi się również zgodzić z fragmentem tekstu ze strony nr 13, w którym autorka pisze: „... aktywacja receptorów estrogenowych przywraca upośledzoną wskutek ischemii przepuszczalność bariery krew-mózg...”. Ischemia zwykle uszkadza integralność bariery krew-mózg i zwiększa jej przepuszczalność, pożądane jest więc jej ponowne uszczelnienie.

W dalszej części tekstu Doktorantka formułuje jasną hipotezę roboczą oraz konkretne cele badawcze, mające tą hipotezę zweryfikować. Celem badań jest wykazanie neuroprotekcynnego działania raloksifenu oraz DIM w hodowlach komórek kory pierwotnej i hipokampa poddanych 18 godzinnej hipoksji oraz wykazanie, że w neuroprotekcynne działanie raloksifenu zaangażowane są receptory estrogenów i PPAR- γ , natomiast działanie DIM wiąże się z hamowaniem szlaku angażującego receptory węglowodorów aromatycznych z równoczesnym aktywowaniem receptorów estrogenów.

Doktorantka przeprowadziła swoje badania na hodowli pierwotnej rozproszonych komórek hipokampa oraz kory mózgu myszy poddanych 18 godzinnej hipoksji i 6 godzinnej reoksygenacji. W prowadzonych badaniach doktorantka korzystała z szerokiego wachlarza metod, od oznaczeń biochemicznych, poprzez cytochemię i immunochemię po nowoczesne metody oznaczania ekspresji mRNA i wyciszania genów. Wiedza i bogaty warsztat badawczy doktorantki świadczy o jej dobrym przygotowaniu do prowadzenia badań w przyszłości, już na samodzielnej ścieżce naukowej.

Metody stosowane w badaniach zawartych w pracy doktorskiej mgr Rzeminec są dobrze dobrane, z jednym tylko zastrzeżeniem. Chodzi o metody barwienia przeżyciowego komórek, które Doktorantka zastosowała w celu badania czy też wykazania zachodzenia procesów apoptozy i nekrozy. Zastosowanymi barwnikami są Hoechst 33342 i kalceina AM. Chociaż Hoechst 33342 może być używany do oznaczeń apoptozy, jest on raczej używany do barwienia jądrowego DNA w komórkach żywych, jako mniej toksyczny niż DAPI, a właściwość jaśniejszego świecenia przy skondensowanym DNA wykorzystywana jest przy wizualizacji komórek w prometafazie. Bardziej właściwą metodą było by wybarwienie pofragmentowanego DNA lub użycie cytometrii przepływowej. Z kolei kalceina AM wybarwia żywe komórki i śmiertelność komórek może być oceniana jedynie pośrednio, poprzez ocenę ich ubytku. Nie można więc mówić o bezpośrednim wykazaniu nekrozy. Może lepsze było by zastosowanie barwników specyficznych dla martwych komórek (jodek propidyny albo homodimer etydydy) lub barwnika stosowanego jako wyznacznika neurodegeneracji (np. z grupy Fluoro-Jade) ? Te uwagi, dotyczące stosowanych barwników, nie mają na celu poddania w wątpliwość uzyskanych wyników, a są jedynie sugestią na przyszłość.

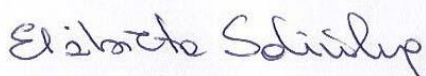
Wyniki zawarte w publikacjach wybranych do przedstawionej rozprawy doktorskiej w logiczny i interesujący sposób prowadzą nas przez kolejne etapy pracy zmierzającej do realizacji postawionych celów badawczych i potwierdzenia założeń hipotezy badawczej. Pierwsze wyniki potwierdzają, że 18 godzinna hipoksja wybranych do badań hodowli neuronów wywołuje większość spodziewanych efektów, jak spadek błonowego potencjału mitochondrialnego, zahamowanie aktywności ATP-azy, uwalnianie dehydrogenazy mleczanowej i zainicjowanie procesów apoptotycznych. Jedyne co nie pasuje do obrazu tych zmian jest brak różnicy w poziomie reaktywnych form tlenu (RFT) pomiędzy hodowlami kontrolnymi a poddanymi hipoksji. Wiadomo, że wzrost poziomu reaktywnych form tlenu jest jednym z ważnych elementów indukowanych hipoksja procesów prowadzących do degeneracji i śmierci neuronów. Jak więc wytłumaczyć taki stan rzeczy? Czy próbowano sprawdzić obecność RFT w jakiś inny, pośredni sposób, na przykład mierząc poziom aldehydu malonowego? Niestety Doktorantka nie podnosi tego tematu w swojej rozprawie doktorskiej, a informacja o poziomach RFT jest jedynie suplementem do drugiej pracy, w dodatku dostępnym jedynie w Internecie. Tu uwaga na marginesie – uważam, że te 4 rysunki będące uzupełnieniem do drugiego z artykułów wchodzących w skład rozprawy powinny być jednak do niej dołączone.

Wyniki badań skupiających się na neuroprotekcynym działaniu raloksifenu i DIM zapobiegającym efektom hipoksji oraz wyjaśnieniu udziału receptorów estrogenu, węglowodorów aromatycznych, PPAR- γ oraz zachodzących między nimi powiązań, dają mocne podstawy do postawionych przez Doktorantkę wniosków końcowych. Obszerna dyskusja wskazuje kolejny raz na dobrą znajomość tematu oraz doskonałe obeznanie z dokonaniem innych badaczy w omawianym temacie. Doktorantka jednak wyraźnie podkreśla nowe elementy, jakie jej badania wniosły do ogólnej wiedzy. Badania te po raz pierwszy wykazały kluczową rolę receptora estrogenu α w neuroprotekcynym działaniu raloksifenu na komórki hipokampa poddane hipoksji, po raz pierwszy wykazano też powiązanie pomiędzy podaniem raloksifenu a stymulacją ekspresji ER α i PPAR- γ obserwowaną w poddanych hipoksji komórkach kory mózgowej myszy. Badania Doktorantki dowiodły też po raz pierwszy kluczową rolę zahamowania ścieżki AhR/ARNT/CYP1A1 w neuroprotekcynym działaniu DIM. Mgr Rzemieniec wykazała również, że choć działanie raloksifenu i DIM może się zająć w niektórych punktach, to efekty ich działania na procesy apoptotyczne są różne: raloksifen hamuje apoptozę niezależną od kaspaz, podczas gdy DIM wpływa na procesy kaspazo-zależne. Uważam, że ten aspekt działania dwóch związków powinien być też zaznaczony na diagramie umieszczonym na końcu rozprawy.

Całość rozprawy doktorskiej wskazuje na dojrzałość mgr Rzemieniec jako naukowca i pozwala wnioskować, że jej przyszła kariera jako samodzielnego badacza będzie godna uwagi. Wszelkie uwagi zawarte w tej recenzji nie umniejszają wartości merytorycznej rozprawy. Wyniki badań w niej zawarte są niewątpliwie ważnym przyczynkiem do badań prowadzonych nad poszukiwaniem nowych punktów uchwytu dla bardziej skutecznych farmakologicznych terapii niedotlenienia mózgu. Duże nadzieje budzi zwłaszcza 3,3'-diindolometan, gdyż raloksifen nie jest niestety pozbawiony niekorzystnych efektów ubocznych, powielających efekty estradiolu.

Reasumując, przedstawiona do oceny praca doktorska mgr Joanny Rzemieniec w pełni spełnia wszelkie wymogi stawiane rozprawom doktorskim zawarte w stosownych ustawach. Dlatego też, z pełnym przekonaniem przedstawiam Radzie Naukowej Instytutu Farmakologii wniosek o dopuszczenie mgr Joanny Rzemieniec do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie doceniając naukowe osiągnięcia Doktorantki, wysoką wartość merytoryczną i oryginalność uzyskanych wyników, wnioskuję o wyróżnienie rozprawy.



Dr hab. Elżbieta Salińska