

Prof. dr hab. n. med. Ewa Obuchowicz
Zakład Farmakologii Katedry Farmakologii
Wydział Nauk Medycznych w Katowicach
Śląski Uniwersytet Medyczny

OCENA

rozprawy doktorskiej mgr Natalii Bryniarskiej-Kubiak

„Ocena udziału mechanizmów neuroimmunologicznych w procesach niedokrwienia mózgu”

Celem rozprawy była ocena udziału trzech chemokin (CX3CL1, CXCL12, CCL2) i ich receptorów w patomechanizmie niedokrwienia mózgu na podstawie badań przeprowadzonych na hodowlach organotypowych hipokampa poddanych procedurze deprywacji tlenu i glukozy. Ten ciekawy projekt badawczy został zrealizowany w Zakładzie Neuroendokrynologii Doświadczalnej Instytutu Farmakologii PAN. Żeby zwiększyć jego translacyjność, część doświadczalna została nieco rozszerzona o badania kliniczne, które wykonano u pacjentów z udarem niedokrwienym mózgu hospitalizowanych w Klinice Neurologii Szpitala Uniwersyteckiego w Krakowie. Uważam, że takie projekty łączące badania eksperymentalne z badaniami klinicznymi są bardzo interesujące i potrzebne, więc zachęcam do kontynuacji projektu we współpracy z jednostkami klinicznymi.

Udar mózgu jest to nagłe wystąpienie ogniskowych deficytowych objawów neurologicznych utrzymujących się ponad 24 godziny i spowodowanych zaburzeniami krążenia mózgowego. Pod względem patogenezy, udary dzieli się na udary niedokrwienne i krwotoczne. Udar stanowi drugą pod względem częstości przyczynę śmierci, a liczba zachorowań ma zwiększać się w kolejnych latach. Bardzo ważna jest zatem, zarówno efektywna profilaktyka, jak również poznanie, w jak największym stopniu, patomechanizmu zmian celem opracowania nowej, bardziej skutecznej terapii udaru niedokrwienego. Biorąc to pod uwagę, uważam że wybór tematu pracy mgr Natalii Bryniarskiej-Kubiak, który nawiązuje do nie w pełni poznanej, a niewątpliwie ważnej roli procesów neuroimmunologicznych w patomechanizmie udaru niedokrwienego jest uzasadniony.

Rozprawa doktorska została przygotowana zgodnie z ogólnie przyjętymi zasadami – liczy

168 stron, podzielona jest na typowe rozdziały i podrozdziały, zawiera wykaz skrotów z ich dwujęzycznym wyjaśnieniem, streszczenie w j. polskim i angielskim, wykaz 256 pozycji piśmiennictwa oraz dwa załączniki – formularze oceny stanu klinicznego pacjenta. Rozprawa powstała w ramach projektu „Interdyscyplinarność dla medycyny innowacyjnej” i była finansowana z grantu NCN Preludium 18, którego Pani mgr jest kierownikiem.

We **WSTĘPIE** (23 strony) Pani mgr przedstawiła istotę udaru, pierwsze jego objawy oraz czynniki ryzyka. Odnosząc się do udaru niedokrwiennego omówiła zaburzenia homeostazy glutamatergicznej oraz występujące w czasie niedotlenienia, jak również w wyniku reperfuzji i następczej reoksygenacji zmiany na poziomie komórkowym i molekularnym prowadzące do śmierci neuronów. Pokrótce przedstawiła możliwości terapii w udarze niedokrwiennym, jak i proponowane strategie terapeutyczne. Następnie omówiła rolę interakcji neuroimmunologicznych w rozwoju uszkodzeń wywołanych udarem, a mianowicie efekty indukowane przez mediatory zapalenia wydzielane przez napływające immunokompetentne komórki obwodowe i komórki glejowe oraz złożoną rolę astrocytów i mikrogleju w patomechanizmie udaru niedokrwiennego. Tym samym Pani mgr podkreśliła ważne zagadnienia związane z tematem pracy. W kolejnym podrozdziale przedstawiła charakterystykę chemokin i ich receptorów, istotne wielokierunkowe działanie chemokin w mózgu i dokładnie omówiła trzy wybrane chemokiny: CX3CL1, CXCL12, CCL2, które były przedmiotem Jej badań. Uzasadniając wybór tematu pracy Pani mgr sformułowała hipotezę badawczą, że wymienione chemokiny ze względu na ich funkcje w OUN mogą mieć znaczenie w neuroimmunologicznych interakcjach w patomechanizmie udaru niedokrwiennego. Następnie scharakteryzowała zwierzęce modele udaru niedokrwiennego wskazując na ich zalety i ograniczenia, a wśród nich model *ex vivo* niedokrwienia – deprywacja tlenu i glukozy (OGD), który wykorzystywała w badaniach. Ciekawie napisany Wstęp, zilustrowany pięcioma ładnie opracowanymi autorskimi rycinami świadczy o dobrym przygotowaniu merytorycznym Autorki.

Głównym **CELEM** projektu było zbadanie czy trzy wymienione chemokiny (CX3CL1, CXCL12, CCL2) mają znaczenie w patomechanizmie niedokrwienia mózgu. Wybór cytokin Pani mgr właściwie uzasadniła ich swoistością działania receptorowego, co dawało szansę oceny udziału układu chemokina-receptor w mechanizmie OGD. Dla rozwiązania problemu Pani mgr założyła trzy cele szczegółowe, z których dwa doprecyzowują zakres doświadczeń w modelu *ex vivo*. Układ pracy jest dobrze przemyślany. Celem rzetelnego przeprowadzenia badań najpierw zweryfikowano procedurę OGD w hodowlach organotypowych hipokampa,

a potem przeprowadzono doświadczenia z użyciem specyficznych antagonistów receptorów chemokinowych (CX3CR1, CXCR4, CCR2), by określić udział wybranych chemokin w niedokrwieniu. Trzecim celem szczegółowym tego szeroko zaplanowanego projektu była analiza stężeń dwóch cytokin (CXCL12 oraz CCL2) w osoczu pacjentów z udarem niedokrwinnym mózgu w odniesieniu do stopnia nasilenia deficytu neurologicznego.

W rozdziale **MATERIAŁY I METODY** (17 stron) zilustrowanym trzema schematami badań Pani mgr szczegółowo przedstawiła zastosowaną metodologię. Doświadczenia w modelu OGD prowadzono na hodowlach organotypowych hipokampa wyprowadzonych z mózgowia noworodków szczurów szczepu Sprague Dawley. Prowadzenie badań na tego typu hodowlach jest bardzo istotną wartością pracy, gdyż hodowle te w dużym stopniu odwzorowują warunki w modelach *in vivo*. Wiadomo jednak, że badania na hodowlach komórkowych oddają jedynie częściowo złożoność sytuacji klinicznej. Proszę, żeby Pani mgr odniosła się do tego problemu.

Dla realizacji celów doświadczalnych Autorka zastosowała szereg narzędzi badawczych wykazanych w trzech tabelkach (uwaga: brak informacji na temat doboru stężeń antagonistów rec. chemokinowych). Warto podkreślić, że w części eksperymentalnej projekt jest bardzo rozbudowany. By zrealizować cele projektu wykonano szereg badań oceniających: żywotność komórek; ekspresję komórek neuronalnych i mikroglejowych, zmiany w strukturze cytoszkieletu aktynowego i mikrotubularnego; stężenie kilku cytokin prozapalnych i przeciwzapalnej oraz trzech chemokin w nadsączu hodowli. Autorka posłużyła się różnymi właściwie dobranymi metodami: kolorymetrycznymi, biochemicznymi, immunofluorescencyjnymi, biomechanicznymi i immunoenzymatycznymi, które zostały dokładnie opisane. W badaniach stosowano konfokalną mikroskopię fluorescencyjną oraz mikroskopię sił atomowych działającą w trybie spektroskopii sił. Tą ostatnią metodę Pani mgr poznała w trakcie stażu naukowego na Uniwersytecie w Mediolanie i samodzielnie wdrożyła do badań na hodowlach organotypowych hipokampa. Badania, których efektem jest szereg nowych ciekawych danych, zostały przeprowadzone w Instytucie Fizyki Jądrowej im. H. Niewodniczańskiego PAN w Krakowie pod kierunkiem Pani prof. M. Lekkiej.

Odpowiednia liczba próbek w grupach pozwoliła na uzyskanie wiarygodnych wyników, które zostały zanalizowane przy pomocy właściwych testów statystycznych.

Pytania: 1). Dlaczego wybrano 40-min ekspozycję na OGD ? Czy były badania pilotażowe ?
2). Wg zapisu na str. 37 po ekspozycji na OGD prowadzono hodowlę w warunkach standardowych, a właściwe doświadczenia przeprowadzano po 24 godz. po OGD – proszę o wyjaśnienie tego schematu.

3). Dlaczego by ocenić działanie chemokiny CX3CL1 dodawano ją do pożywki tylko po OGD na 24 godz., natomiast hodowle były eksponowane na działanie antagonistów rec. chemokinowych na godz. przed i 24 godz. po OGD ?

W części klinicznej badanie, na które uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej UJ przeprowadzono po weryfikacji właściwych kryteriów włączenia i wyłączenia u 54 osób, w tym 35 pacjentów z ostrym udarem niedokrwinnym mózgu. Pani mgr przedstawiła charakterystykę kliniczną pacjentów i przeanalizowała wyniki oznaczeń osoczowego stężenia chemokin CCL2 i CXCL12 w zależności od stopnia „ciężkości” udaru w stosunku do grupy kontrolnej. Niestety sytuacja pandemiczna utrudniła realizację tej części badań, które zostały przeprowadzone na zbyt małej grupie pacjentów, żeby wyciągnąć jednoznaczne wnioski. Czy mogłaby Pani mgr przedstawić na czym polegał plan badań dotyczący modulacji receptorów chemokinowych, którego nie udało się wykonać ?

Realizując część eksperymentalną projektu Pani mgr uzyskała znaczną ilość danych, które przedstawiła w rozdziale **WYNIKI** (57 stron). Wyniki badań zostały rzetelnie udokumentowane na 40 starannie opracowanych rycinach i bardzo dobrych technicznie zdjęciach.

Do interesujących wyników można zapewne zaliczyć stwierdzenie, że:

- 1). po 24 godz. od zastosowania, procedura OGD w hodowlach organotypowych hipokampa wywiera działanie cytotoksyczne szczególnie w regionie CA1, a eliminacja mikrogleju nasila ten efekt. OGD wywołuje zmiany strukturalne dotyczące cytoszkieletu aktynowego i wzrost sztywności komórek hodowli, czemu towarzyszy wzrost stężenia cytokin (IL-6, TNF- α , IL-18) i chemokin (CCL3, CCL5, CXCL10) pro-zapalnych, przy spadku stężenia cytokiny przeciwzapalnej (IL-10),
- 2). antagonistą rec. CX3CR1 osłabia działanie toksyczne OGD, natomiast antagonistą rec. CXCR4 przeciwnie nasila ten efekt
- 3). procedura OGD zwiększa ekspresję chemokiny CCL2, a antagonistą jej rec. CCR2 – irbesartan zmniejsza zarówno działanie cytotoksyczne OGD, stężenie cytokin i chemokin pro-zapalnych, jak i osłabia sztywność hodowli, a tym samym wykazuje działanie przeciwzapalne i protekcyjne w modelu OGD, a efekt ten jest mediowany przez aktywację czynnika PPAR γ
- 4). u pacjentów w ostrej fazie udaru o umiarkowanym lub ciężkim przebiegu wykazano tendencję do wzrostu, odpowiednio, chemokiny CCL2 lub CXCL12.

(Drobna uwaga: w opisie wyników powinno być używane określenie stężenie, a nie synteza).

W dobrze napisanej **DYSKUSJI** (15 stron) Pani mgr, odnosząc się do prac innych

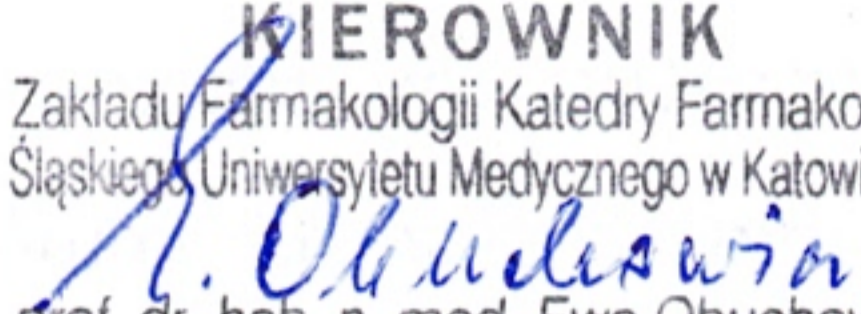
Autorów, również do prac najnowszych, opublikowanych do 2021 r. włącznie, najpierw analizuje wyniki uzyskane w kolejnych etapach badań eksperymentalnych. Zwraca uwagę na elementy nowatorskie pracy, a mianowicie wykorzystanie organotypowych hodowli hipokampa w modelu udaru niedokrwienego – OGD, jak również istotne zmiany właściwości biomechanicznych komórek, którym towarzyszył wzrost stężenia badanych cytokin i chemokin prozapalnych. Cytowana praca przeglądowa opublikowana w *Pharm. Rep.* (2021), której jest pierwszym autorem, świadczy o Jej znajomości zagadnień związanych z rolą właściwości biomechanicznych komórek w patomechanizmie chorób OUN. Autorka przedstawia szereg ważnych danych eksperymentalnych, w tym również dane kontrowersyjne, dotyczące udziału chemokin w różnych fazach niedokrwienia, jak również złożoną rolę mikrogleju. W dalszej części Dyskusji odnosi się do wyników badań klinicznych. Wskazuje na interesujące tendencje zmian w stężeniu badanych chemokin u pacjentów z udarem, które jednak wymagają weryfikacji w dalszych badaniach. W tej części pracy Pani mgr wskazuje również na ograniczenia badań przeprowadzonych przy realizacji projektu.

Przedstawione w końcowej części rozprawy **WNIOSKI** są w pełni poparte uzyskanymi wynikami.

Podsumowując stwierdzam, że przedstawiona do oceny rozprawa Pani mgr Natalii Bryniarskiej-Kubiak jest merytorycznie interesująca. W szeroko zaprojektowanej części doświadczalnej cele pracy zostały w pełni zrealizowane przy zastosowaniu wielu metod i technik badawczych. Autorka wykazała przydatność modelu deprivacji tlenu i glukozy w hodowlach organotypowych hipokampa w badaniach nad neuroimmunologicznymi aspektami patomechanizmu udaru niedokrwienego. Co warte podkreślenia, wykazała efekty biomechaniczne w hodowlach w warunkach zmian charakterystycznych dla procesu zapalnego. Uzyskane przez Panią mgr ciekawe wyniki niewątpliwie mogą inspirować do dalszych badań nad receptorami dla chemokin np. receptorem CCR2 w aspekcie nowych strategii w terapii udaru niedokrwienego. Na uwagę zasługuje również podjęcie próby połączenia badań eksperymentalnych z klinicznymi, celem weryfikacji wyników doświadczalnych. Pod względem edytorskim praca została bardzo starannie przygotowana.

Uważam, że oceniana praca „Ocena udziału mechanizmów neuroimmunologicznych w procesach niedokrwienia mózgu” została zrealizowana na dobrym poziomie i spełnia określone ustawowo warunki dla tego typu prac. Wniosuję do Komisji ds. Prowadzenia

Czynności w Sprawie Nadania Stopnia Doktora przy Radzie Naukowej Instytutu Farmakologii im. J. Maja PAN w Krakowie o dopuszczenie Pani mgr Natalii Bryniarskiej-Kubiak do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

KIEROWNIK
Zakładu Farmakologii Katedry Farmakologii
Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach

prof. dr hab. n. med. Ewa Obuchowicz

Katowice 14 marca 2022 r.