



**PRACOWNIA PATONEUROCHEMII**  
**ZAKŁAD NEUROCHEMII**  
**INSTYTUT MEDYCyny DOŚWIADCZALNEJ I KLINICZNEJ**  
**im. M. Mossakowskiego PAN**

02-106 Warszawa, ul. Pawińskiego 5  
tel./fax: (0-22)-608-66-23  
neurochemia@imdik.pan.pl

Warszawa, 06.10.2022r.

Prof. dr hab. Lidia Strużyńska  
Tel: 22-608 65 76  
e-mail: lidkas@imdik.pan.pl

**Ocena rozprawy doktorskiej**

**Pani mgr Moniki Jankowskiej-Kieltyka**

**p.t. „Badania nad wpływem pyłowych zanieczyszczeń powietrza na progresję zaburzeń neurodegeneracyjnych o podłożu autoimmunologicznym: badania *in vitro* i *in vivo* w mysim modelu eksperymentalnego autoimmunologicznego zapalenia mózgu i rdzenia (EAE)”**

wykonanej w Zakładzie Biochemii Mózgu Instytutu Farmakologii PAN im. Jerzego Maja,  
pod kierunkiem Promotora, Pani Prof. dr hab. n. med. Ireny Nalepy  
i Promotora Pomocniczego, Pana dr n. biol. Adama Romana

**Ocena formalna**

Przedstawiona mi do oceny dysertacja została opracowana w formie klasycznej składającej się ze zwyczajowo przyjętych rozdziałów: Wstęp, Założenia i cel pracy, Materiały i Metody, Wyniki, Dyskusja, Wnioski i Piśmiennictwo. Ponadto, dołączono streszczenia w języku polskim i angielskim, wykaz najważniejszych skrótów, spis rycin oraz tabel, jak również spis publikacji i doniesień konferencyjnych Autorki.

W Jej dorobku naukowym znajdują się 2 publikacje oryginalne opublikowane w uznanych międzynarodowych czasopismach z wysokim wskaźnikiem oddziaływania, 1 publikacja pogładowa oraz jedna popularnonaukowa. Dodatkowo, jedna publikacja oryginalna jest w fazie przygotowywania. Sumaryczny wskaźnik oddziaływania (IF) opublikowanych prac wynosi 16,68, co przekłada się na wysoki IF pojedynczej publikacji (średni IF=5,56 z wyłączeniem publikacji popularnonaukowej).

W 3 publikacjach Pani mgr Jankowska-Kieltyka jest pierwszym autorem, co świadczy o wiodącej roli Kandydatki do stopnia doktora w ich przygotowaniu. Ponadto, jest Ona autorem bądź współautorem 13 doniesień konferencyjnych.

Informacja na stronie tytułowej pracy wskazuje źródła finansowania badań wykonanych w ramach doktoratu, tj. granty NCN SYMFONIA 3 oraz grant realizowany przez konsorcjum UMO-2015/16/W/ST5/00005.

Procedury eksperymentalne z użyciem zwierząt uzyskały akceptację II Lokalnej Komisji Etycznej przy IF PAN (nr zgód: 100/2018; 1234/2015; 210/2019), choć kopie zgód nie zostały dołączone do rozprawy.

Praca jest starannie przygotowana pod względem językowym, graficznym i redakcyjnym. Jej konstrukcja jest zgodna z obowiązującymi wymogami ustawowymi dla oryginalnej rozprawy doktorskiej, jak również z zaleceniami Komisji Rady ds. Prowadzenia Czynności w Sprawie Nadania Stopnia Doktora przyjętymi w IF PAN.

### **Ocena merytoryczna**

Wysokie zanieczyszczenie powietrza w krajach wysokorozwiniętych jest obecnie problemem, który absorbuje gremia społeczne, państwowe i naukowe. Szczególne zainteresowanie budzi tzw. materia cząsteczkowa (PM), stanowiąca mieszaninę cząstek pyłu zawieszzonego w powietrzu, której przypisuje się negatywne skutki zdrowotne w postaci chorób układu krążenia, układu oddechowego, odpornościowego czy nowotworów. W tym kontekście szeroko dyskutuje się również możliwość potencjalnego wpływu PM na rozwój i przebieg chorób ośrodkowego układu nerwowego (OUN), w tym chorób o podłożu neurodegeneracyjnym czy autoimmunologicznym.

Wśród nich wymienia się stwardnienie rozsiane (SM), będące chorobą o niepotwierdzonej etiologii, jako chorobę, w rozwoju której czynniki środowiskowe mogą mieć szczególne znaczenie.

Zatem podjęty przez Doktorantkę temat jest bardzo aktualny z dwóch względów: poszukiwania mechanizmów toksycznego wpływu samej PM na zdrowy organizm, jak też jej potencjalnego udziału w przebiegu SM.

We Wstępie, Autorka wprowadza czytelnika w zagadnienie pyłowych zanieczyszczeń powietrza, dróg ekspozycji oraz mechanizmów ich negatywnego działania na OUN, jak również opisuje patomechanizmy stwardnienia rozsianego i zwierzęcego modelu tej choroby oraz aktualne informacje dotyczące wpływu zanieczyszczeń pyłowych powietrza na te mechanizmy. Opisane treści odwołują się do aktualnych pozycji piśmiennictwa.

Rozdział ten jest dobrze napisany a sposób jej opracowania świadczy o dobrej znajomości literatury związanej z wybranym tematem badań i dobrze uzasadnia podjętą tematykę.

Mam tu jedynie kilka drobnych uwag:

- str.13 – w opisie bariery krew-mózg (BBB) znalazła się nieścisłość – komórki śródbłonna mikronaczyń nie są tożsame z pericytami. BBB jest zbudowana z komórek endotelialnych połączonych ze sobą połączeniami ścisłymi (TJ). Pericyty natomiast są komórkami przylegającymi do endotelium, które razem z blaszką podstawną i wypustkami astrocytów tworzą BBB na poziomie ultrastrukturalnym.
- str. 15 – użyto niefortunnego zwrotu „chroniczna tendencja prozapalna”
  - ...”między komórkami nabłonka jelita i okrężnicy” – chodzi zapewne o jelito **cienkie** i okrężnicę.
- str. 18 – tytuł podrozdziału 1.3.2. logiczniej byłoby zacząć od przenikania BBB z następczą aktywacją mikrogleju
- str. 19 - GFAP – prawidłowa nazwa polska to **kwaśne białko włóknkowe gleju**

- str. 22 – na Ryc. 2 powinien być raczej „wzrost przepuszczalności BBB”
- str. 23 (a także str. 70, 73) – zwrot „tkanka mózgu” jest niepoprawny z punktu widzenia histologicznego – zamiennie można użyć zwrotów: tkanka nerwowa mózgu, ewentualnie **tkanki** mózgowe (bo jest ich kilka), bądź parenchyma mózgowa
- str. 23 – rozdział 1.4. – z racji moich własnych zainteresowań, mam pewien niedosyt informacji o patomechanizmach rozwoju SM (obwodowe komórki układu immunologicznego, procesy związane z rozszczelnieniem BBB, aktywacja mikro- i astrogleju), które natomiast zostały nieco dokładniej omówione przy charakterystyce zwierzęcego modelu tej choroby

Głównym **celem**, jaki postawiła sobie Doktorantka, było zbadanie wpływu ekspozycji na pyłowe zanieczyszczenia powietrza na procesy komórkowe in vitro – w wybranych liniach komórkowych z tkanek potencjalnie zaangażowanych w patomechanizmy SM oraz in vivo – w mysim modelu tej choroby. Cztery ambitne cele szczegółowe, logicznie ze sobą powiązane, doprecyzowują szeroki zakres planowanych badań, które obejmują, analizy biochemiczne i molekularne oraz testy behawioralne.

Wszystkie te analizy zostały wyczerpująco opisane w rozdziale Materiały i metody, wraz z zastosowanymi modelami komórkowymi i zwierzęcym modelem SM (EAE). Dokładnie scharakteryzowano również użytą do badań materię cząsteczkową oraz schemat i warunki ekspozycji. Chcę tu podkreślić bardzo dobre podejście metodologiczne i dokładność Doktorantki przy implementacji mysiego modelu EAE, który jest modelem trudnym i stanowi wyzwanie dla niejednego młodego naukowca. Na podkreślenie zasługuje również skrupulatnie przeprowadzona analiza statystyczna wyników, szczególnie w części badań in vivo dotyczących ekspresji białka GFAP, uwzględniająca różnice osobnicze w odpowiedzi na indukcję EAE.

Do strony metodologicznej pracy mam następujące uwagi i pytania:

- zauważyłam pewne nieścisłości pomiędzy informacjami zawartymi w rozdziale Materiał i metody (Ryc. 5 i 7) i w opisie wyników. Ile czasu trwała ekspozycja na PM 6 czy 8 godz. (str. 43 oraz Ryc. 5 i 7 vs. str. 40 i str. 128) i jak długo eksponowano myszy z EAE – 4 tygodnie (str. 40) czy 7 tygodni (str. 44)?
- w badaniach immunofluorescencyjnych (str. 72-73) nie znalazłam opisu sposobu oceny preparatów. Jak liczone komórki NeuN-, Iba-1- i GFAP-pozytywne?
- jaką skalę objawów przyjęto dla „łagodnego” EAE – 0,5-1,5 (str. 55) czy 1 – 2,5 (str. 38)?
- pierwotne p-ciała – powinno być I-rzędowe (str. 73)

Komentarze:

- Ocenę aktywacji gleju w badaniach immunofluorescencyjnych przeprowadzono na podstawie liczby komórek wykazujących obecność markera. Aktywacja gleju (szczególnie astrogleju) może jednak przebiegać bez jego proliferacji a jedynie z nadekspresją białka markerowego a zatem ocena intensywności immunofluorescencji byłaby tu uzupełnieniem.
- Autorka używa sformułowania „synteza wolnych rodników” (ten rozdział i następne). Ponieważ ROS powstają w komórce w różnych reakcjach (m.in. utleniania, wymiany redox,

czy rozrywania wiązań cząsteczkowych), które niekoniecznie są reakcjami syntezy w rozumieniu chemicznym, unikałabym takiego zwrotu w odniesieniu do **indukcji** ROS na skutek ekspozycji na PM.

W rozdziale Wyniki zaprezentowano drobiazgową analizę niekorzystnych zmian w różnych typach komórek na skutek przedłużonej ekspozycji na zastosowane frakcje PM. Zmiany te obejmowały zmniejszoną żywotność i aktywność metaboliczną komórek związaną z indukcją reaktywnych form tlenu (ROS) oraz, w przypadku frakcji NIST1648a, również aktywację genów odpowiedzi zapalnej w hodowlach makrofagalnych.

Otrzymano również szereg oryginalnych i nowych danych obrazujących mechanizmy działania PM w układzie *in vivo*, zależne od jej rodzaju i składu, obejmujące m.in. zmiany behawioralne w postaci nasilenia zachowań lękowych zwierząt, zmiany w profilu cytokin świadczące o dysregulacji układu cytokinowego, aktywację mikrogleju w OUN o charakterze prozapalnym czy wzrost poziomu leptyny. Jednocześnie, nie wykazano związku pomiędzy ekspozycją zwierząt na nieorganiczną frakcję PM a rozwojem i przebiegiem EAE. Ten wynik, potencjalnie optymistyczny w kontekście skutków zdrowotnych jakie niesie ze sobą zanieczyszczenia powietrza, stanowi jednocześnie inspirację do dalszych badań, być może z zastosowaniem innych modeli chorób OUN o podłożu neurodegeneracyjnym.

Opis wyników badań wzbogacono obszernym i dobrze przygotowanym materiałem graficznym.

Ponieważ ciekawe wyniki zawsze pobudzają do dyskusji, prosiłabym Doktorantkę o próbę wyjaśnienia następujących kwestii:

- 1) Czym może być spowodowany przeciwstawny wpływ wczesnej ekspozycji na obie formy PM na liczbę komórek w linii makrofagalnej oraz w linii komórek neuronalnych (spadek vs. wzrost)?
- 2) Czy stężenia PM zastosowane w ekspozycji *in vitro* oraz *in vivo* mają odniesienie do stężeń środowiskowych?

W wyniku zaplanowanych badań, Doktorantka otrzymała ogromną liczbę danych, często niełatwych do interpretacji. Niemniej, w rozdziale Dyskusja, umiejętnie analizuje Ona otrzymane wyniki w kontekście dotychczasowej wiedzy, udowadniając ich oryginalność i nowatorstwo. Jest to według mnie świetnie napisana część dysertacji, świadcząca o umiejętności dogłębnej analizy naukowej i wskazująca na dużą dojrzałość naukową Doktorantki.

Szerokie spektrum badań oraz wysoką wartość poznawczą otrzymanych wyników doskonale podkreślają wyciągnięte przez Doktorantkę wnioski. Zawartość tego rozdziału stanowi odpowiedź na postawione przez Doktorantkę cele, jasno wykazując, że wszystkie one zostały zrealizowane. Szczególnie cenne w odniesieniu do aktualnych światowych trendów badawczych, są według mnie badania nad wpływem różnych frakcji PM na zdrowy organizm. Wśród nich zainteresowanie budzi wzrost poziomu leptyny, mogący skutkować dysfunkcjami metabolicznymi. Te obserwacje profilują nowy kierunek badań nad tym niepoznanym jeszcze mechanizmem działania różnych substancji na poziomie nano- i mikrocząsteczkowym.

Podsumowując, przedłożona mi do oceny rozprawa prezentuje wysoki poziom naukowy, którego absolutnie nie obniżają wymienione w tej recenzji uwagi.

Spełnia ona całkowicie określone ustawowo warunki dla tego typu prac zawarte w art. 13 Ustawy z dn. 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65/2003, poz. 595 z późn. zm.).

Wnoszę zatem do Komisji ds. Prowadzenia Czynności w Sprawie Nadania Stopnia Doktora przy Radzie Naukowej Instytutu Farmakologii im. Jerzego Maja PAN w Krakowie o dopuszczenie Pani mgr Moniki Jankowskiej-Kiełtyka do dalszych etapów przewodu doktorskiego, wnosząc jednocześnie o wyróżnienie rozprawy.

W uzasadnieniu wniosku o wyróżnienie chcę podkreślić wysoką wartość poznawczą badań nad mechanizmami molekularnymi toksyczności materii cząsteczkowej, jej wpływem na zdrowy organizm oraz potencjalnym udziałem w patologii chorób o podłożu neurodegeneracyjnym i autoimmunologicznym. Badania te wpisują się zarówno w bardzo aktualne trendy badawcze, jak i w potrzeby społeczne w zakresie ochrony klimatycznej i ochrony zdrowia, wnosząc w te obszary nową, szeroką wiedzę.

Wysoki poziom przeprowadzonych w dysertacji badań, potwierdza fakt ich opublikowania w wiodących czasopismach o wysokim współczynniku oddziaływania.

Prof. dr hab. Lidia Strużyńska

