

Kraków, 17 października 2022

Prof. dr hab. Barbara Płytycz
Emerytowany profesor zwyczajny Instytutu Zoologii i Badań Biomedycznych
Wydział Biologii UJ
barbara.plytycz@uj.edu.pl

Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr **Moniki Jankowskiej-Kiełtyki**
z tytułu

„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 Instytucie Farmakologii im. Jerzego Maja PAN w Krakowie,
pod kierunkiem prof. dr hab. n. med. **Ireny Nalepy**
i dr n. biol. **Adama Romana**

Pani mgr Monika Jankowska-Kiełtyka już w roku 2018 była współautorką artykułu popularnonaukowego na łamach *Wszystkiego* o zwierzęcych modelach stwardnienia rozsianego, a w roku 2021 artykułu przeglądowego w renomowanym czasopiśmie *Frontiers in Cellular Neuroscience* dotyczącego skażenia powietrza jako bodźca prozapalnego uczestniczącego w neurodegeneracji. W świetle zastanej wiedzy można się było spodziewać, że atakujący nas smog może inicjować lub nasilać u ludzi epizody stwardnienia rozsianego.

W myśl zasady stanowiącej pierwszy człon artykułu mgr Jankowskiej-Kiełtyki we *Wszystkim*: „Lepiej poznać, by lepiej leczyć” - doktorantka w ramach zespołu prof. Ireny Nalepy podjęła badania nad wpływem pyłowych zanieczyszczeń powietrza PM (*particulatamatter*) na myszy szczepu C57BL/6J z lekką postacią autoimmunologicznego zapalenia mózgu i rdzenia (EAE), wywołanego przez podanie immunogennego syntetycznego peptydu MOG35-55 naśladującego fragment osłonki mielinowej oligodendrocytów.

Wdrożenie modelu EAE w Instytucie Farmakologii przebiegało z najwyższą starannością, aby liczbę myszy doświadczalnych ograniczyć do niezbędnego minimum i zapewnić im dobrostan w trakcie eksperymentów. Co więcej, do badań in vivo przystąpiono dopiero po zrealizowaniu serii badań nad wpływem zanieczyszczeń powietrza na komórki hodowane in vitro.

Standardowym materiałem referencyjnym do badania zanieczyszczeń powietrza są pyły pochodzenia miejskiego w St. Louis, USA, oznaczane akronimem NIST1648a (dalej oznaczane NIST), z których, w ramach współpracy z UJ, pozyskano frakcję LAp120 (LA) pozbawioną substancji organicznych.

W badaniach in vitro wykorzystano powszechnie stosowaną modelową linię makrofagalną RAW264.7 i neuronalną SH-SY5Y oraz hodowlę pierwotną komórek glejowych potencjalnie zaangażowanych w degenerację mózgu. W każdym przypadku porównywano żywotność i aktywność komórek kontrolnych z komórkami poddanymi działaniu NIST lub LA w różnych stężeniach i przez różny okres czasu. Wykazano, że za śmiertelność i obniżającą się aktywność metaboliczną badanych typów komórek odpowiadał stres oksydacyjny spowodowany ekspozycją na PM, paradoksalnie – słabszy po kontakcie z pełną zawiesiną NIST niż z frakcją LA bez składników organicznych. Nasunęło się przypuszczenie, że usunięcie składników organicznych pozbawia frakcję LA szczątków bakterii Gram-ujemnych będących źródłem endotoksyn stymulujących odczyn zapalny; słuszność tej hipotezy udowodniono w odpowiednim teście oraz dzięki eleganckiej analizie ekspresji genów komórek makrofagalnych RAW poddanych działaniu NIST, LA, lub komercyjnego LPS zastosowanego tu jako endotoksyna referencyjna. Okazało się, że NIST – lecz nie LA - stymuluje aktywację genów związanych z aktywnością prozapalną, natomiast za silny stres oksydacyjny wywoływany przez LA odpowiedzialne byłoby ‘zagęszczenie’ skażenia metalami ciężkimi związku z usunięciem frakcji organicznej.

Z części in vitro wynika, że poszczególne składniki pyłowych zanieczyszczeń powietrza mogą indukować stres oksydacyjny i/lub odczyn zapalny, zatem w badaniach in vivo poszerzono listę składników PM zanieczyszczających powietrze o koloidalną krzemionkę w postaci zawiesiny nanocząstek SiO₂ oraz koloidalny trójtlenku żelaza Fe₂O₃.

Grupy zdrowych myszy C57BL/6 poddane w sposób kontrolowany działaniu Fe₂O₃, SiO₂, NIST lub LA przez 14 tygodni miały zahamowany przyrost masy ciała w stosunku do kontrolnych, oraz wykazały nasiloną aktywność motoryczną, zmodyfikowane parametry poruszania się oraz wykazywały zachowania lękowe, jednak tylko nieliczne różnice między grupami były statystycznie istotne. Po 14 tygodniach względna masa oraz komórkowość ich grasic i śledzion nie uległa zmianom i tylko niektóre parametry stresu oksydacyjnego mierzone w osoczu różniły się między grupami w sposób statystycznie istotny. Badania mózgow ujawniły markery aktywacji mikrogleju w korze przedczołowej w grupach narażonych na SiO₂, NIST i LA, lecz nie na Fe₂O₃, natomiast analiza ekspresji mRNA genów związanych ze stanem zapalnym w hipokampie i korze przedczołowej dała wyniki statystycznie istotne tylko w nielicznych przypadkach. Wnadsączach hodowli splenocytów tych zwierząt analizowano metodą macierzy białkowych stężenie mediatorów odpowiedzi immunologicznej; okazało się, że badane zanieczyszczenia powietrza powodowały wzrost lub obniżenie poziomu wielu cytokin i chemokin, zarówno prozapalnych jak i przeciwzapalnych.

Dysponując tak szeroką gamą technik badawczych przystąpiono do badania wpływu zanieczyszczenia powietrza frakcją pozbawioną materii organicznej LA na myszy na myszy C57BL/6J z lekką postacią autoimmunologicznego zapalenia mózgu i rdzenia (EAE) wywołanego przez podanie peptydu MOG35-55 z dodatkiem adiuwantów w postaci *Mycobacterium tuberculosis* oraz doświadczalnie dobranej dawki toksyny krztuścowej PTX. Choroba wywołała przejściowy spadek masy ciała i charakterystyczne objawy behawioralne, których nasilenie zapisywano w ustalonej skali.

Tym razem uformowano tylko cztery grupy eksperymentalne; zdrowe myszy kontrolne (C) poddane wziewnej ekspozycji albo wody (CW) albo LA (CL), oraz w analogiczny sposób traktowane myszy z EAE tworzące grupy EW i EL. EAE indukowano po dwóch tygodniach ekspozycji na W lub L, a badania behawioralne wykonano przed wystąpieniem objawów choroby i w szczytowej fazie jej objawów. Cały czas monitorowano masę ciała, a po zakończeniu eksperymentu podjęto badania ex vivo wybranych narządów, z zastosowaniem metod opisanych i wykorzystanych już uprzednio. Wbrew hipotezie roboczej nie stwierdzono uderzających różnic behawioralnych ani spektakularnych zmian parametrów dotyczących układu odpornościowego między grupą EW i EL, czyli ekspozycja na nieorganiczne zanieczyszczenia powietrza frakcji LA nie wpłynęła w sposób zdecydowanie negatywny na zapadalność i nasilenie objawów behawioralnych EAE, ani nie zmieniła w sposób drastyczny szlaków molekularnych związanych z zapaleniem i/lub stresem oksydacyjnym.

Dyskusja tych wyników jest bardzo ciekawa i drobiazgową. Własne wyniki są konfrontowane z rezultatami innych zespołów; w razie rozbieżności lub pojawiania się wyników nieoczekiwanych Autorka poszukuje ich przyczyn. Szczególnie zainteresował mnie fragment o różnicach sezonowych w składzie PM, który wywoływał silniejszą odpowiedź w sezonie letnim niż zimowym. A może chodzi tam o większą zawartość składników organicznych, w tym endotoksyny bakteryjnej, w okresie letnim? Może – mając tak precyzyjnie opracowany model EAE – warto sprawdzić efekt frakcji organicznej/endotoksyny?

Bardzo ciekawy jest też wątek leptyny, tłumaczący przejściowy spadek masy w modelu EAE. Warto podjąć wzmiankowane tu badania nad wpływem długotrwałego narażenia na PM na leptynę/anoreksję/otyłość.

Kolejny ważny wątek dyskusji – to wpływ odległych skutków prenatalnej lub poporodowej ekspozycji na PM. Może warto tę informację wykorzystać w przyszłych badaniach EAE?

Rozprawa doktorska mgr Moniki Jankowskiej-Kiełtyki ma tradycyjną formę książkową. W każdym przypadku eksperymenty były starannie zaplanowane, metody drobiazgowo opisane, wyniki skrupulatnie zaprezentowane i zilustrowane, a dyskusja jest wnikliwa i obszerna. Autorka powołała się na 272 pozycje literatury z XXI wieku, choć wyławia z niej dane historyczne i już we wstępie nawiązuje do pierwszej spisanej relacji o „powietrzu nie do wytrzymania” w Nottingham w roku 1257, sporządzonej przez Eleonorę Prowansalską, żonę króla Henryka III. Prawdopodobnie wyniki recenzowanej tu pracy doktorskiej byłyby skrajnie odmienne od otrzymanych gdyby komórki i zwierzęta potraktowano zawiesiną smogu z „obwarzanka” wokół Krakowa lub Warszawy, albo z okolic Bełchatowa.

W obszernej (200 stronicowej) pracy nie da się ustrzec usterek. Już w Wykazie skrótów (na str. 2) znajdujemy „PI- jodek potasu (*ang. Propidiumiodine*)” zamiast jodku propidyny; W dyskusji (str. 151) warto czasem użyć pełnej nazwy, zamiast „barwienie komórek PI przyżyciowo” napisać „...przyżyciowe barwienie komórek jodkiem propidyny (PI)”.

W bardzo obszernym „Wstępie” (str. 9-33) pojawiły się zbyteczne powtórzenia. Przy omawianiu bariery krew-mózg (str. 18-20) warto było wspomnieć o nieszczelności tej bariery w niektórych rejonach. Dla płynności tekstu lepiej jest napisać zamiast „...zmniejszanie białek tworzących TJ” „... tworzących złącza ściśle bariery krew-mózg (TJ)” (str. 19). Na str. 25 czytamy „.. pozbawione genów kodujących PL”. Zapewne chodzi o PLP? W tekście razi mnie „klirens” (w kilku miejscach), „plaka” (str. 27), czy „tritracja” (str. 37 i dalsze), ale chyba nie warto zwalczać tych spolszczeń ułatwiających bieżącą komunikację w „labie”.

„Materiały i metody” (str. 36-76) opisane są na ogół bardzo skrupulatnie. W przypadku Rycin 5, 6 i 7, przygotowanych w sposób stosowany na plakatach konferencyjnych, warto byłoby wprowadzić proste symbole CW, CL, EW, EL zastosowane (choć niezbyt konsekwentnie) w rozdziale prezentującym wyniki badań *in vivo* (str. 128 -148). Na końcu osi czasu na Ryc. 7 lepiej zaznaczyć, że narządy pobrano do badań *ex vivo*.

Przy „Oszacowaniu liczby komórek w hodowli” (str. 51) z użyciem fioletu krystalicznego (CV), warto dodać „... liczby komórek przylegających do podłoża..”, gdyż zwrócenie uwagi na to jedno słowo skłoni do reinterpretację Ryc. 33 (str. 103). Komórki kontrolne przylegają ‘trwale’ dopiero w ciągu drugiej doby, natomiast ekspozycja na PM przyspiesza przyleganie do podłoża w ciągu pierwszej doby, a w drugiej dobie następuje ich odrywanie się od podłoża i (prawdopodobnie) obumieranie.

W tekście autorka prawidłowo stosuje się termin ‘masa ciała’, natomiast w podpisach Ryciny 39 (str. 110) i Ryc. 59 (str. 129) pojawia się ‘waga’ zwierząt.

Brak jest konsekwencji w prezentacji wpływu LAp120 na myszy kontrolne i myszy z EAE (str. 128-149). W legendzie ryciny 59 (str. 129) po raz pierwszy pojawiają i stosowane są w większości kolejnych rycin, proste i łatwe do zapamiętania symbole CW, CL, EW, EL, lecz brak ich wytłumaczenia w legendzie tej i wielu innych rycin (jest przy Ryc. 61). Tą samą symbolikę trzeba wprowadzić w Tabeli 12.

Ryc. 60 jest dla mnie niejasna, być może z powodu niepełnej legendy do części B.

W legendach niektórych wykresów słupkowych (Rycin 63-73, str. 133-144) pojawia się informacja o różnicach statystycznie istotnych, lecz brak jest odpowiednich znaczków przy słupkach. Na ryc. 77 trzeba ujednoczyć symbolikę z resztą ilustracji. Trzeba na to uważać podczas przygotowywania do druku artykułu (lub artykułów) związanych z częścią *in vivo*.

Wnioski z zaprezentowanych tu badań zestawiono aż w 14 punktach (str. 171-173). Bardzo obszerne jest też Streszczenie i Summary (str. 3-8). Na koniec, warto więc spojrzeć na uzyskane wyniki „z lotu ptaka”. Przebadane pyłowe zanieczyszczenia powietrza zawierają składniki indukujące (w komórkach badanych *in vitro* oraz w organizmach myszy) uruchamianie szlaków metabolicznych związanych z

odczynem zapalnym i/lub stresem oksydacyjnym. W przypadku komórek in vitro prowadzi to do ich obumierania i spadku aktywności metabolicznej, natomiast żywy organizm ma szanse rozwinięcia mechanizmów adaptacyjnych. Podobne szlaki zostały uruchomione u myszy z eksperymentalnym autoimmunologicznym zapaleniem mózgu i rdzenia (EAE), a progresja choroby nie uległa istotnym zmianom u myszy narażonych na działanie pyłowych zanieczyszczeń pozbawionych frakcji organicznej. Opracowany model i opanowane metody będą przydatne w dalszych badaniach.

Wyliczone tu usterki nie umniejszają wysokiej oceny całości rozprawy doktorskiej i mogą być łatwo usunięte w trakcie przygotowania do druku kolejnych wyników. Dotychczasowy dorobek mgr Moniki Jankowskiej-Kieltyki obejmuje cztery artykuły (piąty w przygotowaniu):

1. Monika Jankowska, Irena Nalepa.: Lepiej poznać, by lepiej leczyć – zwierzęce modele stwardnienia rozsianego. *Wszechświat*. 10-12/2018, str. 244-254
2. Monika Jankowska-Kieltyka, Adam Roman and Irena Nalepa: The Air We Breathe: Air Pollution as a Prevalent Proinflammatory Stimulus Contributing to Neurodegeneration. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 2021, 15 : 647643. IF=6.147
3. Monika Jankowska-Kieltyka, Adam Roman, Magdalena Mikrut, Marta Kowalska, Rudi van Eldik and Irena Nalepa: Metabolic Response of RAW 264.7 Macrophages to Exposure to Crude Particulate Matter and a Reduced Content of Organic Matter. *Toxics* 2021, 9, 205. IF=4.472
4. Adam Roman, Michał Korostynski, Monika Jankowska-Kieltyka, Marcin Piechota, Jacek Hajto and Irena Nalepa: Gene expression changes induced by exposure of RAW 264.7 macrophages to particulate matter of air pollution: the role of endotoxins. *Biomolecules* 2022, 12 (8), 1100. IF=6.064

oraz 13 doniesień konferencyjnych.

Podsumowanie i wnioski

W podsumowaniu stwierdzam, że przedstawiona do zaopiniowania rozprawa „**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)**” spełnia warunki określone w art.13.1 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65 poz. 595 z późniejszymi zmianami) i zwracam się do Rady Naukowej Instytutu Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk o dopuszczenie **Pani mgr Moniki Jankowskiej-Kieltyki** do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Składam też wniosek o wyróżnienie tej rozprawy dotyczącej **bardzo aktualnego problemu ze względu na jej wysoką wartość merytoryczną**. Doktorantka zastosowała różnorodne techniki dostosowane do poszczególnych modeli badawczych, a jasno zaprezentowane wyniki poddała szczegółowej analizie. Część wyników już przeszła proces recenzowania i została opublikowana w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym (*Toxics* i *Biomolecules*).

Barbara Płytycz