

Kraków, 03.03.22

**Recenzja pracy doktorskiej mgr Natalii Bryniarskiej-Kubiak pt. „Ocena mechanizmów neuroimmunologicznych w procesach niedokrwienia mózgu”.**

Udar mózgu jest wiodącą przyczyną niepełnosprawności oraz jedną z najczęstszych przyczyn śmiertelności u osób starszych. Rola systemowej i lokalnej reakcji zapalnej w przebiegu udaru mózgu jest od wielu lat przedmiotem intensywnych badań eksperymentalnych i klinicznych. Tematyka pracy doktorskiej mgr Natalii Bryniarskiej-Kubiak wpisuje się w aktualny nurt badań nad neuroimmunologicznymi mechanizmami ostrego uszkodzenia mózgu.

We „Wstępie” Doktorantka omówiła skrótowo definicję, klasyfikację kliniczną, czynniki ryzyka oraz główne patomechanizmy udaru mózgu. Pewien niedosyt budzi rozdział dotyczący neuroimmunologicznych mechanizmów uszkodzenia mózgu. Chociaż recenzent zdaje sobie w pełni sprawę, że trudno jest podsumować liczne publikacje dotyczące roli reakcji zapalnej w niedokrwieniu mózgu, to omówienie tego zagadnienia przez Doktorantkę jest nieco chaotyczne i fragmentaryczne. Omówienie to byłoby bardziej klarowne dla czytelnika, gdyby Doktorantka przedstawiła, jak zmienia się w czasie skład komórkowy nacieku zapalnego w miejscu niedokrwienia oraz ekspresja wybranych cytokin w mózgu i krwi. W dalszej części rozdziału Doktorantka omówiła klasyfikację chemokin i ich receptorów. Co zaskakujące, Doktorantka w tym miejscu nie przedstawiła żadnych danych literaturowych dotyczących roli chemokin w udarze mózgu. Kończąc podrozdział pisze ona, że „przytoczone powyżej dane

literaturowe ilustrujące szeroki wachlarz biologicznych funkcji chemokin oraz ich receptorów w mózgu stanowić mogą podstawę do postawienia hipotezy badawczej, zakładającej, że zaburzenia w sieci tych białek mogą mieć znaczenie w neuroimmunologicznych patomechanizmach udaru niedokrwiennego...”. Czytelnik może więc odnieść wrażenie, że nic nie wiadomo o roli chemokin w udarze mózgu. Tymczasem wprowadzenie do Pubmedu słów „chemokines” i „stroke” generuje 1506 pozycji piśmiennictwa! Ostatni podrozdział „Wstępu” poświęcony jest omówieniu zwierzęcych modeli udaru niedokrwiennego mózgu.

Ogólny cel rozprawy został zdefiniowany przez Doktorantkę jako weryfikacja hipotezy badawczej zakładającej udział chemokin i ich receptorów w patofizjologii niedokrwienia mózgu. Biorąc pod uwagę aktualny stan wiedzy o roli chemokin w uszkodzeniu mózgu, postawiona hipoteza brzmi bardzo ogólnikowo. Badania na modelach zwierzęcych wykazały bowiem jednoznacznie udział chemokin w patofizjologii niedokrwienia mózgu. Tak sformułowana hipoteza jest jednak do przyjęcia w odniesieniu do modelu *ex vivo* z wykorzystaniem organotypowych hodowli hipokampa poddanych deprywacji glukozy i tlenu (OGD), gdzie niewiele wiadomo o roli chemokin w mechanizmie uszkodzenia mózgu. Szczegółowe cele pracy doktorskiej obejmowały weryfikację procedury OGD w hodowlach organotypowych hipokampa jako modelu niedokrwienia, określenie roli wybranych chemokin i ich receptorów (CX3CL1-CX3CR1, CXCL12-CXCR4, CCL2-CCR2) w niedokrwiennym uszkodzeniu mózgu oraz pomiar stężenia wybranych chemokin (CXCL12, CCL2) w osoczu u pacjentów z udarem niedokrwiennym mózgu. Niejasne pozostaje, jakim przesłankami kierowała się Doktorantka w wyborze chemokin, które były badane w doktoracie (dane literaturowe? wcześniejsze badania pilotażowe? dostępność specyficznych przeciwciał?).

Doktorantka klarownie opisała schemat doświadczeń. Precyzyjnie określone zostały kryteria włączenia i wyłączenia pacjentów z badania. Poprawnie dobrano metody statystyczne do weryfikacji hipotez badawczych. Doprecyzowania wymagają jednak pewne elementy metodologii badania. Nie wiadomo, w jaki sposób dobrano dawki egzogennie dodawanych chemokin oraz modulatorów receptorów oraz ustalono czas inkubacji. Nie jest też jasne, dlaczego stężenie cytokin mierzono w nadsączach, zaś chemokin w homogenatach OHC.

Główne wyniki uzyskane przez Doktorantkę w części eksperymentalnej pracy to:

1. OGD prowadzi do uszkodzenia komórek hipokampa, zwłaszcza w rejonie CA1.
2. OGD powoduje zmiany w organizacji cytoszkieletu mikrotubularnego i aktynowego.
3. OGD prowadzi do wzrostu stężenia IL-6, IL-17, TNF $\alpha$ , CCL3, CCL5, CXCL10 oraz spadku stężenia IL-10 w hodowlach organotypowych hipokampa.
4. Zastosowanie antagonisty receptora CX3CR1 (AZD8797) oraz modulatora receptora CCR2 (Irbesartan) zmniejsza uszkodzenie komórek hipokampa, podczas gdy podanie antagonisty receptora CXCR4 (AMD3100) nasila uszkodzenie komórek poddanych OGD.

Na podkreślenie zasługuje fakt wykorzystania przez Doktorantkę mikroskopii sił atomowych do oceny własności mechanicznych hodowli organotypowych.

Do badań klinicznych włączono 39 pacjentów z ostrym udarem niedokrwiennym mózgu oraz 19 osób grupy kontrolnej. Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w osoczym stężeniu CCL2 i CXCL12 u pacjentów z ostrym udarem niedokrwiennym mózgu w

porównaniu z grupą kontrolną. Ścisłe porównanie stężenia cytokin w tym badaniu może być utrudnione przez fakt, że osoby z grupy kontrolnej były znacząco młodsze niż pacjenci z udarem mózgu (mediana: 56 vs 71 lat).

Na rysunku 4.39 i 4.40 przedstawiono stężenia badanych chemokin u pacjentów z różnym stopniem ciężkości udaru mózgu. W tekście brakuje jednak informacji, jakie było stężenie CCL2 i CXCL12 w całej grupie pacjentów z udarem.

Wyniki, w których różnica pomiędzy badanymi grupami odpowiadała wartości P pomiędzy 0.06 a 0.09, Doktorantka interpretuje jako „tendencję” statystyczną. Chociaż takie podejście nie jest nieuprawnione, sugerowałbym dużą ostrożność w interpretacji takich wyników.

Wyniki badań zostały zilustrowane dobrej jakości wykresami i rycinami/fotografiami.

Zaletą dyskusji jest to, że nie ma ona charakteru dygresyjnego (co nierzadko zdarza się w pracach doktorskich), ale koncentruje się ona ściśle na uzyskanych wynikach i ich omówieniu w kontekście danych literaturowych. Wszystkie ważne publikacje związane bezpośrednio z tematyką doktoratu zostały uwzględnione w dyskusji. W rozdziale tym brakuje mi osobnego akapitu omawiającego ograniczenia metodologiczne badania, chociaż niektóre z tych ograniczeń (np. pomiar chemokin tylko w jednym punkcie czasowym) zostały dostrzeżone i wymienione przez Doktorantkę.

Wyciągnięte przez Doktorantkę wnioski końcowe są zgodne z otrzymanymi wynikami.

Podsumowując, zaletą pracy doktorskiej mgr Natalii Bryniarskiej-Kubiak jest wykazanie przydatności organotypowych hodowli hipokampa poddanych OGD jako modelu do badań mechanizmów neuroimmunologicznych towarzyszących niedokrwieniu mózgu. Metoda ten może być wartościowym uzupełnieniem zwierzęcych modeli udaru mózgu. Na uwagę zasługuje również podjęta przez Doktorantkę próba walidacji uzyskanych eksperymentalnie wyników na materiale ludzkim, co nadaje rozprawie rys translacyjny i interdyscyplinarny. Obiecująco wyglądają również uzyskane przez Doktorantkę wyniki nad modulacją układu CCL2-CCR2, mogące stanowić podstawę do dalszych badań na modelach zwierzęcych. Natomiast słabszą stroną rozprawy jest zbyt ogólnie sformułowana hipoteza badawcza nieodnosząca się do bezpośrednio do już istniejącej literatury przedmiotu.

Przedłożona mi do recenzji rozprawa przynosi nowe, istotne informacje na temat mechanizmów uszkodzenia mózgu w przebiegu niedokrwienia i tym samym spełnia ustawowe wymagania stawione pracom doktorskim. Wnoszę więc do Rady Naukowej Instytutu Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk o dopuszczenie mgr Natalii Bryniarskiej-Kubiak do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Prof. dr hab. Tomasz Dziezic