

Wrocław, 2022-03-14

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr Olgi Katarzyny Wójcickiej pt. „Regulacja metabolizmu mózgu poprzez komunikację pomiędzy astrocytami a neuronami” zrealizowanej w Zakładzie Fizjologii i Neurobiologii Molekularnej pod kierunkiem prof. dr hab. Dariusza Rakusa.

1. Ocena formalna:

Podstawą wykonania niniejszej recenzji jest uchwała nr 109/2021 Rady Dyscypliny Naukowej Nauki Biologiczne Uniwersytetu Wrocławskiego we Wrocławiu z dnia 24 czerwca 2021 roku. Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska składa się z 112 stron maszynopisu w formie wydruku komputerowego w oprawie miękkiej podzielonego na następujące części: spis treści (s.4-6), streszczenie w języku polskim i angielskim (s.7-8) wykaz stosowanych skrótów (s.9-11), cel pracy (s.12) wstęp (s.13-44), materiały i metody (s.45-56), wyniki (s.57-86), dyskusję (s.87-96), spis rysunków i rycin (s.97-98), publikacje i wystąpienia konferencyjne (s. 99), bibliografia (s.101-112). Układ rozprawy, proporcje pomiędzy rozdziałami oraz ich kolejność są typowe dla monografii doktorskich. Praca napisana jest dobrą polszczyzną. Autorka swobodnie posługuje się specjalistycznym słownictwem naukowym, nie zauważyłem bardzo powszechnych w tego typu opracowaniach kalek z języka angielskiego. Tekst pracy jest starannie edytowany, dostrzegłem jedynie nieliczne literówki (s. 50, l.12 i s.51, l.23 powinno być „soli Hanksa”, a jest soli Hanka”). Układ graficzny pięciu rysunków, 23 rycin i jednej tabeli jest czytelny i pomocny w śledzeniu wywodu. Opisy rysunków i rycin są klarowne, Autorka każdorazowo zamieszcza odnośniki do źródeł internetowych lub prac oryginalnych z których pochodzi wykorzystana grafika. Przypisy bibliograficzne w systemie harvardzkim do 155 pozycji literaturowych, w większości wydanych po roku 2000 są używane prawidłowo. Podsumowując, strona formalna ocenianej pracy świadczy o opanowaniu przez Autorkę sztuki prezentacji wyników badań naukowych w formie monografii oraz spełnia kryteria zwyczajowo przyjęte dla rozprawy doktorskiej.

2. Ocena merytoryczna:

Koncepcja astrocytarno-neuronalnego czółenka mleczanowego, zaproponowana w latach 90. przez Pellerin'a i Magistretti'ego wywołała wśród neurobiologów zmianę w postrzeganiu roli astrocytów w regulacji metabolizmu energetycznego neuronów. Wytwarzany przez astrocyty mleczan pełni, według tej koncepcji, istotną rolę w utrzymaniu homeostazy energetycznej prawidłowej tkanki nerwowej, a także, jak się wydaje, rolę neuroprotekcijną w przebiegu niektórych schorzeń neurodegeneracyjnych (np. choroby Huntingtona, choroby Alzheimera) i urazowych uszkodzeń mózgu.

Z kolei wytwarzany przez neurony glutaminian pobudza glikolizę w astrocytach, której nasilenie znacznie przewyższa zapotrzebowanie energetyczne samych astrocytów stając się źródłem mleczanu wydzielanego pozakomórkowo i dostępnego dla neuronów. Postuluje się, że oprócz powyżej opisanych istnieje znacznie szersza sieć obecnie mało poznanych sygnałów o charakterze parakrynnym, które regulują wzajemny metabolizm energetyczny neuronów i komórek gwałowych. Przedmiotem ocenianej rozprawy doktorskiej było zbadanie zmian poziomu ekspresji enzymów metabolizmu węglowodanów oraz ekspresji białek mających związek z plastycznością neuronalną w kohodowlach mysich neuronów z astrocytami. Celem pogłębionych badań stała się próba lepszego zdefiniowania natury czynników mających wpływ na podwyższenie ekspresji fruktozo-1,6-bisfosfatazy (kluczowego enzymu glukoneogenezy) obserwowanego w kohodowlach neuronalno-astrocytarnych. Prezentowane badania stanowią rozwinięcie wcześniejszej pracy zespołu kierowanego przez prof. Dariusza Rakusa z 2014 roku, wykonanej na modelu hodowli neuronów szczurzych, w której autorzy wykazali po raz pierwszy, że wzajemne interakcje między astrocytami a neuronami istotnie wpływają na ekspresję i lokalizację subkomórkową podstawowych enzymów metabolizmu węglowodanów w obu typach komórek. Uważam, że lepsze poznanie roli enzymów podstawowego metabolizmu komórkowego w utrzymaniu homeostazy układu nerwowego, a także w procesach tworzenia śladów pamięciowych w neuronach hipokampa stanowi istotną i zasadną przesłankę dla wyboru zaproponowanej tematyki rozprawy doktorskiej wpisującej się w aktualny nurt badawczy neurobiologii eksperymentalnej.

We wstępie dokonano syntetycznego przeglądu aktualnej literatury dotyczącej budowy układu nerwowego, roli oddziaływań neuronów z komórkami gwałowymi, metabolizmu węglowodanów i wielofunkcyjności zakonserwowanych ewolucyjnie enzymów metabolizmu glukozy takich jak heksokinaza czy fruktozo-1,6-bisfosfataza. Sporo miejsca poświęcono na opis białek takich jak Hif-1a, NFkB, kinazy syntazy glikogenu, w kontekście ich roli w regulacji komunikacji międzykomórkowych i koordynacji procesów plastyczności synaptycznej. Omówiono także koncepcję astrocytarno-neuronalnego czółenka mleczanowego oraz jego roli w procesach formowania pamięci. Tekst tego rozdziału bardzo dobrze wprowadza czytelnika w zrozumienie prezentowanych w części wynikowej oznaczeń. Zauważyłem tu jedynie kilka błędów formalnych. W opisie glikolizy na s. 17, l.24 wkradła się nieścisłość związana z rozkładem fruktozo-1,6-bisfosforanu, z którego powstaje fosforan dihydroksyacetonu, a nie jak podano, dihydroksyacetone. W opisie glukoneogenezy na s. 20 l.19 pominięto swoisty dla glukoneogenezy enzym karboksykinazę fosfoenolopirogronianową przekształcającą szczawiooctan do fosfoenolopirogronianu. Użyto także (s.20, l.18) błędnej nazwy enzymu „karboksylazy fosfoenolopirogronianu”, która powinna brzmieć: „karboksylaza pirogronianowa”. W opisie fosfofruktokinazy (s.22 l. 30) błędnie podano produkt reakcji 6-fosfofruktozo-2-kinazy, którym jest fruktozo-2,6-bisfosforan, a nie „fruktozo-2,6-bisfosfataza”.

Cel pracy jest w mojej ocenie sformułowany jasno. Wyszczególniono dwa obszary obszary badań, tj. identyfikację zmian wywołanych przez astrocyty na poziom metabolizmu węglowodanów w

hodowlach neuronów myszy, a także próbę znalezienia czynników pochodzenia astrocytarnego, w domyśle czynników wydzielniczych, które byłyby za te zmiany odpowiedzialne.

W rozdziale „Materiały i metody” opisano w sposób szczegółowy odczynniki wykorzystywane w badaniach oraz procedury i metody statystyczne do interpretacji istotności uzyskanych wyników. Na podkreślenie zasługuje bogaty wachlarz technik laboratoryjnych użytych w pracy. Począwszy od hodowli *in vitro* neuronów i astrocytów oraz kohodowli neuronalno-astrocytarnych, poprzez immunofluorescencyjną detekcję poziomu ekspresji białek, detekcję mRNA metodą FISH, izolację mikropęcherzyków z podłoża hodowlanych, detekcję białek metodą Western blotting. Zaplanowane eksperymenty oraz przeprowadzone procedury badawcze spełniają kryteria dobrej praktyki laboratoryjnej i pozwalają na wyciąganie istotnych wniosków.

Rozdział „wyniki” został podzielony na pięć logicznie wyróżnionych części. Spójna szata graficzna zachowana pomiędzy poszczególnymi częściami, bardzo ułatwia ocenę i interpretację uzyskanych wyników. W pierwszej części zbadano wpływ astrocytów na poziom białka i mRNA dla heksokinazy 1 i 2 (Hk1 i Hk2), fosfofruktokinazy 1 (Pfkp), kinazy pirogronianowej (Pkm) i Fbp2 w neuronach z kohodowli. Wykazano statystycznie istotne zmniejszenie poziomu ekspresji białka heksokinazy 1 oraz podwyższenie ekspresji białka Hk2 i Fbp2. Na stronie 60 błędnie podano, że „zaobserwowano ponad 30% wzrost fluorescencji związanej z obecnością mRNA kodującego Hk2 w kohodowli” chociaż rycina 4 wskazuje na spadek tej fluorescencji. W kolejnej części oszacowano wpływ astrocytów na poziom ekspresji czynników Hif-1a, NF-kB i Gsk3b na poziomie białka. Obserwowano obniżenie ekspresji Hif-1a, podwyższenie ekspresji NF-kB i podwyższenie ufosforylowanej, nieaktywnej formy pGsk3b. Uzyskany wzorzec ekspresji sugerował wpływ astrocytów na nasilenie procesów plastyczności synaptycznej w neuronach. W kolejnych rozdziałach używano mikropęcherzyków, podłoża kondycjonowanych znad hodowli astrocytów, a także mleczanu w celu ustalenia ich wpływu na poziom ekspresji Pkm i Fbp2 w neuronach na poziomie białka. Mikropęcherzyki, których pobieranie przez neurony potwierdzono metodą immunodetekcji barwnika PKH67 powodowały istotne statystycznie obniżenie poziomu Pkm oraz znaczące, 60-70% podwyższenie poziomu Fbp2 w neuronach – podobny wynik obserwowano w kohodowlach neuronalno-astrocytarnych, co może świadczyć o ich dominującej roli w tym procesie. W tym kontekście ciekawymi byłby eksperyment w którym zastosowano by inhibitor wydzielania mikropęcherzyków (np. inhibitor białka RAB27), aby dodatkowo ocenić udział czynników rozpuszczalnych w tym procesie. W kolejnych rozdziałach jednak, częściowo odpowiedziano na to pytanie poprzez eliminację pęcherzyków z pożywki znad hodowli astrocytów (przez ultrawierwienie) i traktowanie neuronów supernatantem. Wykazano, że pożywka zawiera czynniki rozpuszczalne, wydajnie wpływające na obniżenie ekspresji Fbp2. Mleczan na pewno gra tu rolę, jednak Ryc. 19b sugeruje, że podwyższenie poziomu Fbp2 w neuronach traktowanych roztworem mleczanu jest niższe niż w przypadku traktowania komórek podłożem kondycjonowanym lub supernatantem znad hodowli astrocytarnej.

W dyskusji Autorka konfrontuje uzyskane wyniki między innymi z doniesieniami o niemetabolicznych funkcjach enzymów metabolizmu węglowodanów. Bardzo ciekawy jest akapit dotyczący heksokinazy 2 (s. 87-88), w którym zwraca uwagę na to, że podwyższenie poziomu Hk2 w neuronach na skutek obecności astrocytów może mieć związek z wiązaniem tego enzymu do zewnętrznej błony mitochondrialnej i przeciwdziałać apoptozie zależnej od uwolnienia cytochromu c. Czy zatem można uznać, że warunki kohodowli neuronalno-astrocytarnej wiążą się ze stresem neuronów wywołanych np. przez zaburzenie stosunku pirogronian/mleczan w stosowanej pożywce Neurobasal-A lub dość niskiego (2,5mM) stężenia glukozy? Autorka również odnosi się do obserwacji podwyższenia poziomu białka Fbp2 w neuronach z jednoczesnym obniżeniem poziomu mRNA dla tego enzymu (s. 89). Także w tym przypadku dane literaturowe sugerują związanie/stabilizację formy dimerycznej Fbp2 przez kontakt z zewnętrzną błoną mitochondrialną, co z jednej strony mogłoby przeciwdziałać apoptozie, z drugiej promować plastyczność sieci neuronalnej i sprzyjać wytworzeniu długotrwałego wzmocnienia synaptycznego. Zebrane wyniki bezsprzecznie wskazują, że obecność astrocytów lub produktów uwalnianych przez nie do pożywki (np. mikropecherzyków, mleczanu) zmienia ilość bądź stabilność enzymów metabolizmu węglowodanów w badanym układzie eksperymentalnym, co może mieć znaczenie dla homeostazy układu nerwowego.

3. Podsumowanie:

Podsumowując, przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska, stanowi oryginalne rozwiązanie istotnego problemu naukowego, wykazuje ogólną wiedzę Doktorantki oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia przez Nią badań naukowych. Wartość naukowa prezentowanych badań jest znacząca biorąc pod uwagę, że zostały one opublikowane w pięciu czasopismach specjalistycznych o zasięgu międzynarodowym, w których Pani mgr Olga Katarzyna Wójcicka jest wiodącą współautorką. W mojej opinii wyniki tych badań przyczyniają się do postępu w dyscyplinie naukowej reprezentowanej przez Doktorantkę.

4. Wniosek końcowy:

W mojej ocenie przedłożona mi do recenzji rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595, z późn. zm.). Dlatego przedkładam wysokiej Radzie Dyscypliny Naukowej Nauki Biologiczne Uniwersytetu Wrocławskiego we Wrocławiu wniosek o dopuszczenie Pani mgr Olgi Katarzyny Wójcickiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Arkadiusz Miązek