

Warszawa, 18.02.2022

Dr hab. Joanna Dzwonek

Pracownia Biofizyki Komórki

Instytut Biologii Doświadczalnej im. M Nenckiego PAN

Ul. Pasteura 3 02-093 Warszawa

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Olgi Wójcickiej
pt. „Regulacja metabolizmu mózgu poprzez komunikację pomiędzy astrocytami a
neuronami”

Rozprawa doktorska mgr Olgi Wójcickiej pod tytułem „Regulacja metabolizmu mózgu poprzez komunikację pomiędzy astrocytami a neuronami” została przygotowana pod kierunkiem promotora Pana prof. dr. hab. Dariusza Rakusa w Zakładzie Fizjologii i Neurobiologii Molekularnej na Wydziale Nauk Biologicznych Uniwersytetu Wrocławskiego.

Przedstawione w rozprawie doktorskiej badania nawiązują do bardzo ważnego tematu współczesnej neurobiologii, dotyczą bowiem komunikacji pomiędzy komórkami glejowymi astrocytami a neuronami. Badania prowadzone w ostatnich latach jednoznacznie wskazują, że astrocyty pełnią aktywną rolę w czynności neuronalnych połączeń synaptycznych. Mimo intensywnych badań, dokładne mechanizmy molekularne leżące u podstaw komunikacji astrocyt-neuron w ośrodkowym układzie nerwowym nie zostały jak dotąd poznane. W pełni uzasadnione wydaje się zatem podjęcie tej tematyki przez Doktorantkę. Mgr Olga Wójcicka postawiła sobie za cel opisanie wywołanych przez astrocyty zmian w metabolizmie węglowodanów w neuronach i podjęła próbę identyfikacji pochodzących od astrocytów czynników, które mogłyby być za te zmiany odpowiedzialne. W szczególności doktorantka zbadała ekspresję wybranych kluczowych enzymów metabolizmu węglowodanów (heksokinazy, fosfofruktokinazy oraz fruktozo-1,6-bisfosfatazy), a także białek zaangażowanych w regulację metabolizmu węglowodanów w neuronach (czynnika indukowanego hipoksją 1 α , czynnika jądrowego κ B, kinazy syntazy glikogenu 3 β). Doktorantka porównywała poziomy białka i mRNA wybranych enzymów oraz czynników transkrypcyjnych w neuronach hodowanych *in vitro* bez obecności astrocytów (tzw. monohodowle) oraz w neuronach hodowanych razem z astrocytami (tzw. kohodowle). Poziom białka oceniany był na podstawie barwień immunofluorescencyjnych z użyciem specyficznych

przeciwiał. Detekcji mRNA dokonano metodą fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ*. Doktorantka przeprowadziła również analizę ilościową oraz statystyczną otrzymanych wyników. Badania wykazały, że obecność astrocytów w hodowli neuronalnej wpływa znacząco na ekspresję niektórych badanych białek i kodujących je mRNA w neuronach. Co ciekawe, zmiany w poziomie mRNA w większości przypadków nie odzwierciedlają tych obserwowanych na poziomie białka. Najbardziej znaczące zmiany w poziomie ekspresji Doktorantka zaobserwowała dla Hk2, Fbp2 oraz NFκB, dla których poziom białka w kohodowli wzrastał, a poziom mRNA malał. Kolejny etap badań miał na celu sprawdzenie czy zaobserwowane zmiany w ekspresji odpowiadają mikropęcherzyki wydzielane przez astrocyty. W tym celu monohodowle neuronalne inkubowano z wyizolowanymi poprzez ultrawirowanie mikropęcherzykami astrocytarnymi i sprawdzano jaki to miało wpływ na ekspresję enzymów metabolicznych Pkm1/2 oraz Fbp2 w neuronach. Badania wykazały, że poziom immunofluorescencji dla PKM1/2 spadał, a dla Fbp2 rósł po dodaniu frakcji z mikropęcherzykami. Co ciekawe, w przypadku Fbp2 poziom białka w neuronach wzrastał zarówno po dodaniu zwirowanych mikropęcherzyków, pożywki zebranej znad hodowanych astrocytów, jak również tzw. supernatantu, czyli pożywki pozostałej po ultrawirowaniu mikropęcherzyków, co sugeruje, że czynnik odpowiedzialny za stymulację ekspresji Fbp2 w neuronach znajduje się we wszystkich trzech testowanych frakcjach. W kolejnym kroku Doktorantka sprawdziła czy mleczan, który jest wydzielany przez astrocyty do przestrzeni zewnątrzkomórkowej, a następnie jest pobierany przez neurony, mógłby być takim czynnikiem regulującym poziom Fbp2 w neuronach. Hodowle neuronalne inkubowano w obecności mleczanu i/lub inhibitora jego transportu do neuronów. Poziom białka Fbp2 w neuronach, badany zarówno techniką immunofluorescencji, jak i Western Blot, wzrastał po podaniu mleczanu do monohodowli neuronalnych. Wzrost ten był blokowany przez podanie inhibitora. Wyniki otrzymane przez Doktorantkę dla kohodowli neuronalno-astrocytarnej nie są już tak jednoznaczne. Zastosowanie inhibitora nie zahamowało wzrostu poziomu białka Fbp2 wywołanego obecnością astrocytów w hodowli. Doktorantka zaobserwowała nieznaczny efekt inhibitora na poziom Fbp2, ale nie był on istotny statystycznie. Kolejne wyniki otrzymane przez Doktorantkę sugerują, iż obserwowane zmiany poziomu Fbp2 wywołane obecnością astrocytów nie są spowodowane zmianą ilości transportera Mct2 na powierzchni błony neuronów. Na koniec Doktorantka potwierdziła, iż obserwowany efekt wzrostu ilości białka Fbp2 w neuronach w kohodowli nie zależy od typu astrocytów.

Rozprawa doktorska mgr Olgi Wójcickiej napisana jest starannie. Nieliczne błędy literowe mają charakter marginalny i nie zakłócają ogólnego odbioru pracy. Recenzowana praca ma układ klasyczny, typowy dla tego rodzaju rozpraw. Praca liczy 112 stron i składa się z następujących rozdziałów: Streszczenie (w języku polskim i angielskim), Wykaz skrótów, Cel pracy, Wstęp, Materiały i Metody, Wyniki, Dyskusja, Spis rysunków i rycin, Publikacje i wystąpienia konferencyjne Doktorantki oraz Bibliografia (155 pozycji). W przedstawionej pracy zabrakło mi końcowego rozdziału zawierającego podsumowanie wyników i wyciągnięte wnioski. Choć elementy te zostały zawarte w rozdziale Dyskusja, to wyodrębnienie ich w oddzielnym paragrafie byłoby cenne dla zwiększenia przejrzystości pracy.

Cel pracy jest sformułowany jasno i logicznie. We **Wstępie** rozprawy mgr Olga Wójcicka wprowadza nas w przedmiot swoich zainteresowań. Ten rozdział obejmuje 31 stron i stanowi kompetentny przegląd zagadnień wiążących się z tematem rozprawy w oparciu o aktualny stan wiedzy. Poszczególne podrozdziały zawierają podstawowe wiadomości niezbędne dla zrozumienia założeń pracy. Doktorantka podaje ogólną charakterystykę komórek występujących w mózgu, w szczegółowy i klarowny sposób przedstawia procesy metabolizmu węglowodanów oraz opisuje badane w swojej pracy białka związane z tym metabolizmem. Dalej Doktorantka opisuje działanie czółenka mleczanowego i jego rolę w procesach formowania pamięci. Wstęp rozprawy kończy charakterystyka mikropęcherzyków z uwzględnieniem ich roli w ośrodkowym układzie nerwowym.

Rozdział **Materiały i Metody** składa się z 12 stron i zawiera 8 tabel, w których umieszczono informacje o używanych odczynnikach. Ponadto zawiera także wyczerpujące opisy stosowanych technik: przygotowywania i prowadzenia neuronalnych i astrocytarnych hodowli pierwotnych, immunofluorescencyjnej detekcji białek, fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ*, metody Western Blot oraz izolacji mikropęcherzyków.

Wyniki przedstawione na 23 rycinach zostały opisane w sposób jasny i klarowny. Do tego rozdziału mam kilka uwag:

Na rycinach przedstawiono zdjęcia komórek obserwowanych w mikroskopie konfokalnym. Zastosowano marker neuronalny MAP-2 dla uwidocznienia neuronów. Zabrakło barwień z użyciem przeciwciał specyficznych dla białek astrocytarnych, co uwiarygodniłoby tezę, iż monohodowle neuronalne rzeczywiście pozbawione są astrocytów. Z mojego doświadczenia wynika, że pomimo dodawania inhibitora proliferacji komórek AraC, często astrocyty nadal rosną w hodowli neuronalnej. Dlatego też w przypadku porównywania przez

doktorantkę dwóch rodzajów hodowli zawierających bądź nie astrocyty, istotne wydaje się wykazanie, że monohodowle są jednorodną hodowlą neuronalną.

Uwagę zwraca także różna morfologia komórek przedstawionych na kolejnych rycinach. Np. neurony na rycinach 2B i 10A wyglądają zupełnie inaczej niż komórki na pozostałych zdjęciach. Takie zmiany morfologiczne mogą świadczyć o słabszej kondycji hodowli neuronalnej, która jest trudna do prowadzenia i wrażliwa na wiele czynników. Mogło to mieć wpływ na otrzymane przez Doktorantkę wyniki poziomu ekspresji białka i mRNA.

Na wszystkich rycinach przedstawiających zdjęcia z mikroskopu zabrakło skali.

W doświadczeniach opisanych w podrozdziale 4.3, w których stosowano mikropęcherzyki izolowane z pożywki zebranej znad astrocytów, autorka nie wykazała, że neurony w przeprowadzonych przez Nią eksperymentach rzeczywiście pobierały mikropęcherzyki. Podparła się jedynie zdjęciem z publikacji macierzystego laboratorium (Ryc. 15). W przeprowadzonych własnoręcznie eksperymentach Doktorantka powinna również skontrolować pobieranie mikropęcherzyków przez neurony.

Także w rozdziale 4.3 doktorantka pisze : „*W następnym etapie badań sprawdzono, czy za niektóre z obserwowanych zmian odpowiadają mikropęcherzyki wydzielane przez astrocyty. Do tego etapu badań wybrano dwa z wcześniej badanych białek: Pkm1/2 (...) oraz Fbp2 (...)*”. Zastanawiam się dlaczego wybrano białko Pkm1/2 skoro wcześniejsze badania nie wykazały zmian w poziomie białka i mRNA dla PKM1/2 (Ryc. 7 i 8)?

Na stronie 72 autorka stwierdza : „*(...) obecność astrocytów prowadzi do nasilenia procesów związanych z plastycznością synaptyczną w neuronach. W konsekwencji może to prowadzić do powstawania długotrwałego wzmocnienia synaptycznego i tworzenia nowych połączeń synaptycznych.*” Takie stwierdzenie mogłoby sugerować, że hodowanie neuronów w obecności astrocytów, co jest naturalnym środowiskiem dla neuronów *in vivo* i *in vitro*, skutkowałoby wywołaniem długotrwałego wzmocnienia synaptycznego. Chyba nie do końca to autorka miała na myśli, zwłaszcza że w Dyskusji na str. 92 przedstawiła ten sam wniosek w bardziej odpowiedni sposób pisząc o zwiększonym potencjale neuronów w kohodowli do zachodzenia zjawisk plastyczności synaptycznej w porównaniu do neuronów z monohodowli.

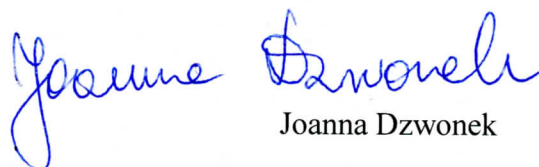
Rycina 17D przedstawia zdjęcie Western Blot, na którym prążki odpowiadające białku Fbp2 są prawie niewidoczne. Brakuje też analizy statystycznej na panelu E tej ryciny. Podobnie, brak takiej analizy na panelu B Ryc. 20.

Podsumowując moje wrażenia z lektury opisu wyników, chciałabym podkreślić, że pomimo przedstawionych uwag uważam, że ten rozdział zawiera oryginalne osiągnięcia badawcze o istotnym znaczeniu poznawczym.

Dyskusja rozprawy jest ciekawa, Doktorantka dobrze orientuje się w literaturze naukowej dotyczącej przedmiotu badań, dobrze przedstawiła swoje wyniki na tle badań innych autorów i odpowiednio zacytowała adekwatne pozycje literatury. W Dyskusji zabrakło mi jednak uzasadnienia przez Doktorantkę wyboru modelu badawczego. W wielokrotnie cytowanej przez Doktorantkę pracy Mamczur i wsp. z 2015 r stosowano podobny model tylko komórek szczurzych z krótszym czasem kohodowli z astrocytami. Dlaczego autorka zdecydowała się na wydłużenie czasu kohodowli z 24 do 48 godzin?

Powyższe uwagi nie wpływają na dobrą ogólną ocenę pracy, a wyniki osiągnięte przez Doktorantkę przyczyniają się do zrozumienia procesu komunikacji pomiędzy neuronami a astrocytami, a co więcej zachęcają do kontynuowania badań, zweryfikowania wyników i ich uzupełnienia.

W podsumowaniu stwierdzam, że rozprawa doktorska Pani mgr Olgi Wójcickiej spełnia warunki określone w art.13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2014 r. poz. 1852, z późn. zm.). Wnoszę więc do Wysockiej Rady Dyscypliny Naukowej Nauki Biologiczne Uniwersytetu Wrocławskiego o dopuszczenie Pani mgr Olgi Wójcickiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.


Joanna Dzwonek