

Olsztyn, 22 stycznia 2022 r.

dr hab. Piotr Podlasz  
Katedra Patofizjologii, Weterynarii Sądowej i Administracji,  
Wydział Medycyny Weterynaryjnej,  
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski  
w Olsztynie

### RECENZJA

**rozprawy doktorskiej mgr Magdaleny Kędry pt. „Charakterystyka zmian molekularnych, neuroanatomicznych oraz behawioralnych w modelu stwardnienia guzowego w danio przęgowanym tsc2<sup>vu242/vu242</sup>”.**

Podstawą prawną przygotowania recenzji jest uchwała Rady Naukowej Instytutu Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego PAN z dn. 8 grudnia 2021 r. oraz pismo Dyrektora Instytutu z dn. 10 grudnia 2022 r.

Rozprawa doktorska mgr Magdaleny Kędry została przygotowana w Pracowni Neurobiologii Molekularnej i Komórkowej Międzynarodowego Instytutu Biologii Molekularnej i Komórkowej w Warszawie pod kierunkiem promotora Prof. dr hab. Jacka Jaworskiego oraz Promotor pomocniczej dr Justyny Zmorzyńskiej.

Stwardnienie guzowate jest rzadką chorobą wielonarządową powodująca zmiany w nerkach, sercu, mózgu, płucach i skórze. Choroba ta jest uwarunkowana genetycznie i jest spowodowana mutacjami genów TSC1 i TSC2. Produkty w/w genów (hamartyna i tuberyna) tworzą kompleks zaangażowany w regulację podziałów komórkowych, hamujący szlak sygnalizacyjny mTOR. Mutacja w jednym z w/w genów powoduje, że kompleks ten jest nieaktywny. Zaburza to podziały komórkowe, co skutkuje zmianami rozwojowymi już na wczesnych etapach rozwoju osobniczego. Pierwsze symptomy choroby pojawiają się już w życiu płodowym i postępują we wczesnym dzieciństwie. U chorych często możemy zaobserwować zaburzenia neurologiczne, w tym padaczkę, ale również neuropsychiatryczne m.in. agresję, hiperaktywność, stany depresyjne, występowanie spektrum autyzmu, zaburzeń lękowych oraz niepełnosprawność intelektualną o różnym stopniu nasilenia. Mimo tego, że jak właściwe wszystkie choroby dziedziczne stwardnienie guzowate jest chorobą nieuleczalną, zastosowanie terapii na odpowiednio wczesnym etapie może zapobiegać pojawianiu się niektórych zmian, znacząco spowolnić rozwój choroby czy też łagodzić jej objawy. W tym celu niezbędne jest poznanie molekularnego podłoża choroby i oczywiście opracowanie terapii. Z reguły te cele spełnia się przy użyciu modeli zwierzęcych. W swojej pracy Doktorantka podjęła się trudu scharakteryzowania zmian molekularnych, neuroanatomicznych oraz behawioralnych

modelu stwardnienia guzowatego stworzonego z użyciem danio pręgowanego jako organizmu modelowego. Danio pręgowany ostatnimi laty stał się bardzo popularnym organizmem modelowym w badaniach naukowych. Organizm ten posiada wiele bardzo interesujących zalet, które czynią go świetnym modelem w badaniach neurobiologicznych. Jego niewątpliwą zaletą jest to, że umożliwia niskokosztowe, wysokoprzepustowe badania przesiewowe umożliwiające opracowywanie nowych terapii chorób zwierząt i ludzi. Ten aspekt został także wykorzystany w recenzowanej rozprawie doktorskiej, gdzie Doktorantka wykazała pozytywny wpływ testowanych substancji w badanym przez nią modelu stwardnienia guzowatego.

W swojej pracy Doktorantka wykorzystwała mutanty  $tsc2^{vu242/vu242}$  danio pręgowanego gdzie gen *tsc2* posiada punktową mutację typu nonsense, co powoduje powstanie nieaktywnego białka Tsc2 bez domeny katalitycznej. Mutacja ta występująca w formie homozygotycznej jest letalna i powoduje śmierć larw do stadium 11 dni po zapłodnieniu. Jednakże nie uniemożliwia to badań, gdyż zdecydowaną większość z nich można wykonać na stadiach embrionalnych, bądź larwalnych do 5 dpf, co zostało wykorzystane w recenzowanej rozprawie doktorskiej.

W swoich badaniach Doktorantka skupiła się na aspekcie stwardnienia guzowatego związanego ze zmianami w centralnym układzie nerwowym.

Recenzowana praca doktorska ma klasyczny układ. Składa się ze streszczenia w języku polskim i angielskim, szczegółowego spisu treści, wykazu używanych skrótów (4 strony), wstępu (37 stron), celu pracy, opisu materiałów i metod (22 strony), opisu wyników (36 stron), dyskusji z podsumowaniem (19 stron), opisu wyciągniętych wniosków (1 strona) i spisu piśmiennictwa liczącego 333 numerowanych pozycji. Koniec pracy wieńczy rozdział wymienionymi publikacjami doktorantki. Obydwie opublikowane w wybitnych czasopismach naukowych, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (IF 11,205, gdzie Doktorantka jest pierwszym autorem) oraz *Cell* (IF 41,584). Wstęp został wzbogacony jedenastoma rycinami oraz jedną tabelą, zaś w opisie materiałów i metod zamieszczono liczne tabele oraz ryciny ilustrujące skład odczynników, listę przeciwciał, linii danio pręgowanego, starterów, warunki reakcji użytych w badaniach, itp. W rozdziale „Wyniki” możemy znaleźć 17 rycin zawierających 78 wykresów. Oprócz tego możemy znaleźć tam liczne obrazy mikroskopowe oraz ilustracje pokazujące wyniki analiz metodą Western blot.

We wstępie składającym się z 7 podrozdziałów Doktorantka dokonuje szczegółowego opisu patofizjologii stwardnienia guzowatego, modeli zwierzęcych oraz molekularnych podstaw tej choroby. Wyczerpująco opisuje rozwój neuronów w stwardnieniu guzowatym oraz wybrane szlaki sygnałowe ważne dla rozwoju neuronów. W ostatniej części wstępu doktorantka

skupia się na opisanu roli danio pręgowanego w badaniach zaburzeń układu nerwowego oraz na istniejących modelach tej choroby stworzonych z wykorzystaniem tego organizmu modelowego.

W moim odczuciu Wstęp napisany jest bardzo dobrze. Czyta się go bardzo przyjemnie. Jest świetnie zaplanowany. Nie można mieć żadnych zarzutów co do stylu czy też składni. Rozdział dotyczący wykorzystania danio pręgowanego jako organizmu modelowego nie pokazuje jedynie jego standardowych zalet, ale wyraźnie akcentuje te zalety, które dla tematu badań są najbardziej istotne. Czytelnik nie ma wątpliwości dlaczego ten model został użyty i dlaczego jest to słuszny wybór. Poza tym w rozdziale tym Doktorantka stanęła przed trudnym zadaniem opisanu w języku polskim tego co zna literatury angielskojęzycznej. Jest to jak wiemy często spory problem. Moim zdaniem świetnie się z tego wywiązała, dobrze zbalansowawszy przekład nomenklatury angielskiej na język polski. Choć trzeba przyznać, że purysta językowy mógłby znaleźć kilka wyrażen, które mogłyby budzić jego obiekcje. Mimo tego, że jak wspominałem wcześniej wstęp napisany jest świetnie, nie jest jednak pozbawiony nielicznych niedociągnięć, niejasności bądź niezręczności językowych. Przede wszystkim nieco niezręcznie brzmi określenie, które przewija się przez całą rozprawę doktorską i które jest moim zdaniem używane nie zawsze poprawnie. Mam tu na myśli określenie „w danio pręgowanym”. Doktorantka używa go dla przykładu w wyrażeniach „mechanizm neurulacji w danio pręgowanym”, „organizacja układu nerwowego w danio pręgowanym”, „odpowiednikiem kory mózgowej w danio pręgowanym”, „w danio pręgowanym heterozygoty wykazują”, „W danio pręgowanym strukturą mózgu odpowiedzialną”. Czy tak samo użyłaby przyimka „w” jeśli dotyczyłoby to innego organizmu, np. myszy? Użyła by wyrażenia „w myszy” czy też „u myszy”?

Podrozdział 1.4.1 „Kompleks TSC1-TSC2 w różnicowaniu i migracji neuronów”, nie do końca odpowiada jednoznacznie jaki jest wpływ kompleksu TSC1-TSC2 w różnicowaniu neuronów, gdyż Doktorantka podaje sprzeczne informacje nie odnosząc się do tego. Chodzi o wyrażenia „...zwiększona aktywność mTORC1 spowodowana utratą TSC1 skutkuje **przedwczesnym różnicowaniem..**” a zaraz potem ... „**O opóźnieniu w procesie różnicowania** świadczyło...”

Odnosnie opisywanego dymorfizmu płciowego opisanego w rozdziale „Danio pręgowany, jako organizm modelowy” nie zgodziłbym się z Doktorantką co do różnic w ubarwieniu samca i samicy. Co prawda różnice w ubarwieniu można dostrzec u niektórych szczepów danio pręgowanego, nie są też one najważniejszą cechą rozróżniająca płci u tego

gatunku, jednak moje doświadczenie podpowiada mi, że przewagę zółci wykazują raczej samce, a nie samice jak to opisuje Doktorantka.

Ryc. 1.5 Cykl rozwojowy danio pręgowanego. Nie jest precyzyjnym wyrażenie, że „po 24 godzinach...są obecne wszystkie narządy”. Poza tym rycyna przedstawiające wg schematu 24 hpf embrion wygląda raczej na nieco młodszy, moim zdaniem na 20hpf. Podobnie rycina przedstawiająca swobodnie pływającą larwę jeszcze taką nie jest.

Zdanie „W zsekwencjonowanym genomie ryby zidentyfikowano ponad 70% ortologów ludzkich genów, a wśród tych, które wywołują choroby aż 82% miało swój odpowiednik w danio pręgowanym” jest moim zdaniem niezręcznie sformułowane. Nie powinniśmy twierdzić że geny wywołują choroby. Podobnie opis na Ryc. 1.6 „geny chorobotwórcze” moim zdaniem także nie jest zbyt szczęśliwie dobrany. Na tejże rycinie jest błąd dotyczący procentu ortologów u danio pręgowanego w oparciu o bazę PedAM, powinno być 74,6%, a nie 14,6%. Poza tym moim zdaniem wykresy te mogą dać złudną informację, że liczba genów u danio pręgowanego jest mniejsza niż u człowieka, a jest odwrotnie. U człowieka liczbę genów w genomie kodujących białka ocenia się na ok. 20 tys., zaś u danio pręgowanego na ok. 26 tys.

Zaskakujące jest też to dlaczego akurat brak chromosomów płciowych u danio pręgowanego Doktorantka uznała za najważniejsze ograniczenie modelu, nie wspominając np. o braku w mózgowiu anatomicznie wyróżnionych, ważniejszych w aspekcie prowadzonych badań, takich struktur jak hipokamp, ciało migdałowate czy też kora nowa. W czasie czytania części wstępu dotyczącej budowy anatomicznej układu nerwowego danio pręgowanego odnosi się wrażenie, że Doktorantka nie do końca potrafi stosować prawidłową nomenklaturę anatomiczną. Dla przykładu „...opuszkę węchową położoną nosowo”, powinno być „donosowo” bądź też „rostralnie”. W zadaniu „Z tyłomózgowia pochodzą szlaki nerwowe unerwiające głowę i inne części ciała w tym skrzela”, domyślam się że miała na myśli nerwy czaszkowe. Angielskie wyrażenie „*medial pallium*” doktorantka tłumaczy jako „część środkowa pallium”, jednak powinno to być „część przyśrodkowa pallium”, bądź też „część przyśrodkowa płaszcz”. Dalej już poprawnie tłumaczy „*dorsomedial*” jako „grzbietowo-przyśrodkowy”.

Mam także pewne krytyczne uwagi co do Ryc. 1.7 „Rozwój mózgu danio pręgowanego”. Dlaczego w mózgu dorosłego osobnika nie ma podziału na kreso- i międzymózgowie, a jest w przypadku mózgu larwy? Przecież ten podział u dorosłego jest lepiej widoczny. Nie zgodziłbym się też z oznaczeniem miejsca lokalizacji szyszynki. Jest to gruczoł, który wyraźnie wystercza ponad powierzchnię mózgowia, a nie jest jak to jest widoczne na rycinie twór leżący w głębi mózgowia pod uzdeczką. Poza tym wydaje mi się, że w tym

przypadku warto by było jednak pozostać przy skrótach pochodzących od angielskich wyrażeń, gdyż są one lepiej znane i zdecydowana większość z nich pasuje także do łacińskich nazw struktur mózgowia.

Mam także zastrzeżenie co do Ryc. 1.9. „Porównanie budowy mózgu danio pręgowanego, myszy i człowieka”. Samą rycinę uważam, za bardzo przydatną, jednakże nie zgadzam się z modyfikacjami oryginalnej ryciny na której podstawie powstała. Mam tu na myśli nazewnictwo części płaszczka. Doktorantka postanowiła zmienić oryginalne nazewnictwo z ryciny z publikacji Langova i wsp. (2020) na własne. Rozumiem intencję doktorantki, która chciała nazwać te części w oparciu o ich pochodzenie. Jak opisuje wcześniej kresomózgowie danio pręgowanego powstaje na skutek ewersji, nie jak w przypadku ssaków inwersji cewy nerwowej. Powoduje to, że część przyśrodkowa (nie środkowa jak nazywa ją Doktorantka) przesuwa się na stronę boczną i w mózgu dorosłego osobnika stanowi strefę boczną grzbietowego obszaru kresomózgowia (dorsal zone of dorsal telencephalic area), lub wg Langova i wsp. (2020) „lateral pallium” (boczne pallium/płaszcz). Także nazwanie „central pallium” w mózgu dorosłego osobnika „częścią grzbietowa pallium” tylko dlatego że przypuszczalnie pochodzi ona od części grzbietowej cewy nerwowej, jest moim zdaniem zbyt daleko posuniętym neologizmem. Sugerowałbym jednak używanie ogólnie przyjętego nazewnictwa anatomicznego stosowanego przy opisywaniu budowy mózgowia danio pręgowanego. Ewentualnie rozszerzyć opis pod ryciną 1.9 informujący, że nazewnictwo jest zmienione w celu wyjaśnienia aspektu rozwojowego kresomózgowia u danio pręgowanego.

Ryc. 1.11 „Schemat struktury przewidywanych domen białkowych TSC2 u człowieka i danio pręgowanego (Tsc2)”. Kolory na rycinie nie zgadzają się z opisem.

Cele pracy są opisane jasno i precyzyjnie. Nie mam co do nich żadnych zastrzeżeń.

Podobnie w przypadku rozdziału „Materiały i metody” trzeba zaznaczyć, że jest on napisany w sposób klarowny i bez poważnych uchybień. Opisywane techniki są nowoczesne, ale przede wszystkim dobrze dobrane, aby zrealizować cele badań postawione sobie przez Doktorantkę w pracy doktorskiej. Jednak niejako z obowiązku recenzenta zwrócę uwagę na kilka niejasności i uchybień, które moim zdaniem w tym rozdziale się znajdują. Firma Tecniplast, producent systemu do hodowli danio pręgowanego jest firmą pochodząca z Włoch a nie z USA jak to opisuje Doktorantka. Wyniki w dużej mierze opierają się o 2 przeciwciała skierowane przeciwko 2 formom białka Rps6. Producenci tych przeciwciał nie wskazują danio pręgowanego jako gatunku, u którego ich przeciwciało powinno wykazywać reaktywność. Na jakiej podstawie wybrano te właśnie przeciwciała i czy były one w jakiś sposób testowane na tkankach danio pręgowanego? Czy była zbadana homologia immunogenu do sekwencji tego

białka u danio pręgowanego? Na zdjęciach prezentowanych w recenzowanej rozprawie doktorskiej analiza z użyciem techniki Western blot pokazuje obecność 2 prążków. W materiałach na stronie producenta widoczny jest pojedynczy prążek, jak to wytłumaczyć? Czy do analizy były brane obydwie czy tylko jeden z nich? Który? Co ciekawe czasami jeden z nich jest mocniejszy, a czasami drugi. Czym są te prążki?

Tabela 3.5 wyszczególnia bardzo interesujący szczep. *Tg(HuC:GCaMP5G);tsc2vu242* w tle genetycznym *casper*. Szczerze mówiąc bardzo liczyłem na wyniki uzyskane przy użyciu tego szczepu. Zawiodłem się nie odnajdując ich w recenzowanej rozprawie.

W opisie przeprowadzenia reakcji ddPCR Doktorantka pisze, że użyła 50 ng matrycy cDNA. W jaki sposób dokonała pomiaru stężenia cDNA? Nie jest też jasne dlaczego akurat gen *gapdh* został użyty jako gen referencyjny. Na jakiej podstawie został wybrany?

Na uzyskanie dobrego efektu barwienia techniką immunohistochemiczną bardzo duże znaczenie ma poprawne utrwalenie tkanki. Dobrze by było, aby Doktoranta uściśliła w jakiej temperaturze było przeprowadzone utrwalanie. To byłoby pomocne dla osób, które chciałyby skorzystać z jej doświadczenia.

Nie jest też jasne jakie rozcieńczenie przeciwciał pierwotnych stosowała w barwieniach immunofluorescencyjnych. W opisie jest 1:50 – 1:200, natomiast w Tab. 3.2 1:150 – 1:250. Poza tym uważam że „poziomu ekspresji białka w ciele ryby” ma marginalne znaczenie przy doborze rozcieńczenia przeciwciała pierwotnego, decydują inne parametry, związane głównie z samym przeciwciałem (odczynnikiem). W opisie barwienia immunofluorescencyjnego Doktorantka nie wspomina o płukaniu po inkubacji z przeciwciałem pierwotnym. W procedurze nie było stosowane? Nie jest też jasne ile było inkubacji w gradiencie glicerolu. Każda trwała ok. 12h więc ich ilość znacząco wpływa na długość całej procedury barwienia.

W rozdziale Wyniki, który warto tu przypomnieć liczy 36 stron, znajdujemy ogromną ilość wysokiej jakości danych, które świetnie realizują postawione przed Doktorantką cele pracy. Kolejne podrozdziały opisują wyniki eksperymentów, które podjęła się wykonać Doktorantka, aby scharakteryzować badany przez siebie model stwardnienia guzowego pod względem molekularnym, neuroanatomicznym i behawioralnym. Analizując wyniki pozyskane przez Doktorantkę nie można nie zauważyć jej szerokiej wiedzy, która umożliwiła wykonanie tych wszystkich eksperymentów oraz ogromu pracy, która włożyła w pozyskanie tych wyników. Co ważne praca ta skutkowała pozyskaniem bardzo wartościowych danych, a jak wiemy nie zawsze ilość pracy jest skorelowana z jakością uzyskanych wyników. Jednakże w tym przypadku nie mam wątpliwości, że nie tylko ilość, ale i jakość jest na bardzo wysokim poziomie. Tym niemniej mam kilka uwag także i do tego rozdziału rozprawy doktorskiej. Na

samym początku opisu wyników Doktorantka odnosi się do badanego przez siebie modelu twierdząc, że organizm tego modelu jest "całkowicie pozbawiony genu *tsc2*,". W następnym zdaniu używa wyrażenia „Usunięcie genu *tsc2*”. Nie mam wątpliwości, że Doktorantka wie, że linia *tsc2<sup>vu242</sup>* przez nią używana w badaniach posiada gen *tsc2*, jednak mutacja punktowa, która jest w niej obecna spowodowała, że gen ten ulega ekspresji tworząc białko Tsc2 bez domeny katalitycznej. Zresztą dość szczegółowo opisuje to we Wstępie.

W wynikach brakuje mi nieco danych dotyczących morfologii larw *tsc2<sup>vu242</sup>*. We wstępie doktorantka wspomniała że mutanty *tsc2<sup>vu242/vu242</sup>* mają problem z napełnianiem pęcherza pławnego. Czy ten fenotyp także się zdarzał u larw użytych do eksperymentów? Pojawienie się takiego fenotypu mogłoby mieć znaczący wpływ na wyniki uzyskane w czasie badań behawioralnych.

Zastanawiam się także czy jest sens prezentować takie same dane na dwa różne sposoby, jak to ma miejsce w przypadku wykresów na Ryc. 4.6. B i C oraz 4.7 B i C? Czy nie lepiej byłoby wybrać jedną formę, które lepiej ilustruje pozyskane wyniki?

Ryc. 4.8 D. Na rycinie tej pokazano wpływ rapamycyny na aktywności mutantów *tsc2<sup>-/-</sup>*. Jest tam też przedstawiona aktywność larw typu dzikiego *tsc2<sup>+/+</sup>* jednakże jedynie nie traktowanych rapamycyną. Moim zdaniem brakuje nieco wyników z aktywności larw typu dzikiego *tsc2<sup>+/+</sup>* traktowanej rapamycyną. Co pokazałoby różnicę w zachowaniu się larw o tych 2 odmiennych genotypach pod wpływem ekspozycji na rapamycynę. Wyniki te są przedstawione osobno na rycinach 4.8 A i C, jednak trudno je na 2 osobnych wykresach porównać. Dodanie jeszcze jednej linii nie powinno zmniejszyć czytelności wykresu. Poza tym w legendzie Ryc. 4.8D jest niepotrzebnie zaznaczony genotyp *tsc2<sup>+/-</sup>*, który nie jest prezentowany na w/w rycinie. Podobne uwagi mam w przypadku wykresów pokazujących aktywność larw traktowanych wigabatryną i ANA-12 (czyli ryc. 4.8 F i H).

Ryc. 4.9. A i B. Nie jest jasne czy wyniki przedstawione na tych wykresach pochodzą z jednego, czy 2 osobnych eksperymentów. Wydawać by się mogło, że do pozyskania tych wyników wystarczy jeden eksperyment. Jeśli był to jeden eksperyment, a przebyty dystans zależy od czasu i prędkości to dlaczego wykresy różnią się? Jeśli wynik na ryc. A pokazuje dystans przebyty przez larwę w czasie 3 s. jak to sugeruje opis to dlaczego prędkość (cm/s) na wykresie 4.9. B nie jest 3x niższa?

Ryc. 4.12 A. Prezentowane obrazy pozyskane od larw genotypu *tsc2<sup>+/+</sup>* wydają się być pokazane w większym powiększeniu niż pozostałe. Brak paska skali uniemożliwia ich porównanie. Brak paska skali dotyczy również pozostałych rycin. Poza tym w rozdziale

Materiały i Metody nie ma wzmianki o sposobie zliczania komórek P-Rps6, nie ma też wzmianki o użyciu tego przeciwciała do barwienia immunofluorescencyjnego w Tab. 3.2. W jaki sposób były liczone te komórki? W jakim obszarze?

Dyskusja napisana jest na wysokim poziomie dowodzącym dobrego zorientowania Doktorantki w literaturze dotyczącej tematu pracy. Cała dyskusja jest dobrze zaplanowana i widać, że ma spełnić konkretny cel. W podrozdziałach Dyskusji Doktorantka bardzo sprawnie analizuje pozyskane przez siebie wyniki konfrontując je z wynikami innych badaczy, ale przede wszystkim rozważa czy model mutanta danio pręgowanego linii *tsc2<sup>vu242/vu242</sup>* jest użytecznym modelem w badaniu oraz poszukiwaniu nowych terapii stwardnienia guzowatego, co było jak miemam jednym z głównych przesłanek dla których Doktorantka podjęła się tych badań. Duża część dyskutowanych wyników stanowią wyniki uzyskane z analiz behawioralnych. Ich interpretacja nie jest łatwa tym bardziej zasługuje na podkreślenie faktu, że Doktorantka świetnie się z tego zadania wywiązała. Zdaję sobie sprawę z tego, że ze względu do ogrom pozyskanych wyników nie sposób przedyskutować wszystkiego, jednak moim zdaniem zabrakło choć kilku zdań dyskusji na kilka tematów. Czy podanie rapamycyny wcześniej niż w stadium 48hpf nie mogłoby przynieść większych korzyści? Czy zastosowanie innego leku przeciwpadaczkowego niż wigabatryna mogłoby mieć bardziej pozytywny efekt w tym modelu? Czy opisywane we wstępie liczne wielonarządowe patologie, które rozwijają się u homozygotycznych mutantów *tsc2<sup>vu242/vu242</sup>* skutkujące śmiercią w 11 dpf, nie mogą mieć wpływu na ich zachowanie się w wieku 5dpf?

Poza tym nie zgadzę się z Doktorantką w stwierdzeniu że „obecność białka P-Rps6 w komórkach ....wskazuje na nadaktywność ścieżki mTORC1”. Z pewnością miała na myśli nie samą obecność, a jego podwyższony poziom. Także nie rozumiem co wyniki analizy morfologii uzdeczek u larw linii *tsc2<sup>vu242</sup>* robią w Dyskusji? Nie powinny być w rozdziale Wyniki?

Przedstawione powyżej uwagi krytycznie w niczym nie zmniejszają wysokiej merytorycznej oceny pracy doktorskiej. Uważam, że stanowi ona bardzo znaczący wkład w badania nad stwardnieniem guzowatym. Podsumowując, stwierdzam, że oceniana rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478, 619, 1630) i wnoszę do Komisji Doktorskiej Rady Naukowej Instytutu Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego PAN o dopuszczenie mgr Magdaleny Kędry do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora. Jednocześnie, chciałbym wystąpić o wyróżnienie ocenianej pracy doktorskiej stosowną nagrodą ze względu na jej wysoką wartość naukową.

Prof. P. Polak





## **KATEDRA I ZAKŁAD PATOFIZJOLOGII**

UNIWERSYTETU MEDYCZNEGO W LUBLINIE

*ul. Jaczewskiego 8b, 20-090 Lublin*

tel.: +48-81-448-65-00

fax: +48-81-448-65-01

kierownik: prof. zw. dr hab. n. med. Stanisław J. Czuczwar

(stanislaw.czuczwar@pan.pl)

**Recenzja pracy doktorskiej „Charakterystyka zmian molekularnych, neuroanatomicznych oraz behawioralnych w modelu stwardnienia guzowego w danio przegowanym tsc2<sup>vu242/vu242</sup>” wykonanej przez mgr Magdalenę Kędrę pod kierunkiem prof. Jacka Jaworskiego (promotor) i dr Justyny Zmorzyńskiej (promotor pomocniczy) w Pracowni Neurobiologii Molekularnej i Komórkowej Międzynarodowego Instytutu Biologii Molekularnej i Komórkowej w Warszawie**

Stwardnienie guzowate jest schorzeniem neurologicznym autosomalnie dominującym w trakcie dziedziczenia (1/3 przypadków) - w 2/3 przypadków jest wynikiem mutacji sporadycznej. Częstość występowania wynosi ok. 1/20 tys. urodzeń. Jego charakterystyczną cechą jest występowanie łagodnych guzów (tzw. hamartoma), które mogą dotyczyć ośrodkowego układu nerwowego, nerek, płuc, serca, skóry, kości i gałek ocznych. U większości pacjentów (85%) stwierdza się mutacje dotyczące genów TSC1 i TSC2 – u pozostałych chorych może np. występować somatyczny mozaicyzm lub mutacje w intronach. Charakterystyczną cechą stwardnienia guzowatego jest występowanie napadów drgawkowych, z których duża część jest lekooporna oraz objawów neuropsychiatrycznych, mogących mieć bardzo różnorodny charakter (depresja, lęk, autyzm, ADHD i wiele innych). Leczenie

stwardnienia guzowatego nadržęca wiele problemów, szczególnie wobec lekoopornych napadów padaczkowych. W tym kontekście podjęte przez Doktorantkę badania mają ogromne znaczenie nie tylko z punktu widzenia poznawczego ale też, moim zdaniem, praktycznego. Podjęła się Ona dogłębnej charakterystyki modelu doświadczalnego (na bazie larw Danio pręgowanego) stwardnienia guzowatego pod kątem behawioralnym, neuroanatomicznym i molekularnym. Potwierdzenie patomechanizmów obserwowanych zmian w modelu zwieręcym w ramach zgodności z patomechanizmem choroby u ludzi stwarza znakomite możliwości do poszukiwania nowych leków o większej skuteczności do leczenia stwardnienia guzowatego w warunkach klinicznych. Warto jest zaznaczyć, że przeprowadzone w niniejszej dysertacji badania dotyczą także oceny potencjalnego leku, substancji ANA-12.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska ma charakter typowy, liczy 163 strony wydruku komputerowego i zawiera 31 rycin, 11 tabel oraz 333 pozycje piśmiennictwa głównie z ostatnich 15 lat.

Wstęp zawiera 38 stron wydruku i moim zdaniem obejmuje wszystkie aspekty, które powinny się w nim znaleźć. Ponadto został napisany w sposób interesujący i został poddany korekcie (podobnie jak cały tekst), jako że nie rzucają się w oczy błędy literowe. Doktorantka w początkowej części Wstępu szczegółowo omawia podłoże patofizjologiczne stwardnienia guzowatego oraz towarzyszące mu objawy. Dużo miejsca poświęca rodzajom napadów padaczkowych oraz różnorodnym objawom neuropsychiatrycznym. W podrozdziale dotyczącym obecnej terapii stwardnienia guzowatego, zostały przedstawione rapamycyna i jej analogi oraz rola, jaką pełnią w terapii napadów padaczkowych. Kolejnym lekiem, omówionym przez Doktorantkę, jest wigabatryna z podaniem danych zarówno klinicznych jak i uzyskanych w modelach zwieręcych. Dodatkowo Doktorantka słusznie zwraca uwagę na problemy terapeutyczne dotyczące leczenia objawów neuropsychiatrycznych, począwszy

od prawidłowego ich rozpoznania a skończywszy na efektywności rapalogów, co do których dane kliniczne nie są jednoznaczne. Kolejna część Wstępu została poświęcona modelom zwierzęcym stwardnienia guzowatego – głównie w odniesieniu do myszy i szczurów. Badania można prowadzić na mutantach heterozygotycznych lub powstających drogą mutacji spontanicznych (szczur Eker). Doktorantka słusznie zwraca uwagę na fakt, że badania na modelach mysich i szczurzych wymagają dużych nakładów czasowych i finansowych. Ponadto niemożliwe są eksperymenty na mutantach homozygotycznych w związku z ich dużą śmiertelnością. Część molekularna Wstępu obejmuje m.in. szczegółowe mechanizmy prowadzące do wystąpienia objawów chorobowych na skutek wypadnięcia funkcji genów TSC1 lub TSC2, co prowadzi przez szereg etapów pośrednich do aktywacji kinaz mTOR. Dużo miejsca poświęca Doktorantka roli kompleksu białkowego TSC1-TSC2 w różnicowaniu neuronalnym i migracji neuronów, analizując podłoże powstawania dysplazji korowych, guzków korowych i innych struktur guzo-podobnych. Dalej na tle zmian w w/w kompleksie białkowym Doktorantka analizuje nieprawidłowości w rozwoju aksonów oraz działaniu połączeń synaptycznych. Wreszcie zostały przedstawione dane nt. roli ścieżek sygnałowych kontrolujących rozwój neuronów – szlak DOCK-ELMO-RAC oraz BDNF-TrkB. Końcowa część Wstępu została poświęcona danio pręgowanemu i zaletom wykorzystywania tej ryby w badaniach schorzeń ośrodkowego układu nerwowego. Szczególne ważne są takie cechy jak szybki cykl rozwojowy i duże tempo wzrostu. Ponadto Doktorantka zwraca uwagę na fakt zewnętrznego zapłodnienia, co pozwala na obserwacje embrionów oraz ułatwione manipulacje genetyczne lub chemiczne. Ważnym także aspektem jest znaczna homologia genetyczna pomiędzy danio pręgowanym a człowiekiem (70% ortologów ludzkich genów). Powyższe cechy zdaniem Doktorantki stanowią b. dobry punkt wyjścia do zastosowania tego modelu w badaniach nad stwardnieniem guzowatym. Na zakończenie Wstępu Doktorantka opisuje modele stwardnienia guzowatego uzyskane za pomocą manipulacji genetycznych u

danio pręgowanego oraz wstępne badania behawioralne, elektrofizjologiczne i biochemiczne. Do tej pory brak jest jednak oceny budowy anatomicznej mózgu mutantów  $tsc2^{-/-}$  oraz zaburzeń neuropsychiatrycznych. W tej sytuacji cel badań składających się na rozprawę doktorską wydaje się w pełni uzasadniony. Zakłada on charakterystykę zmian behawioralnych, molekularnych i neuroanatomicznych w modelu stwardnienia guzowatego ( $tsc2^{-/-}$ ) na bazie danio pręgowanego. Ponadto postanowiono zbadać wpływ wigabatryny (leku przeciwpadaczkowego) i substancji ANA-12 (o potencjalnym działaniu anksjolitycznym) na zmiany patologiczne reprezentowane przez model stwardnienia guzowatego.

Rozdział Materiał i Metody został opracowany bardzo szczegółowo na 22 stronach wydruku. Doktorantka przedstawiła listę stosowanych roztworów, buforów i substancji/leków w rozbudowanej formie tabelarycznej. W tejże formie scharakteryzowała również linie danio pręgowanego używane podczas badań. Rozdział ten zawiera ponadto opis hodowli dorosłych ryb i postaci larwalnych oraz zasady genotypowania larw linii  $tsc^{vu242}$ . W dalszej części Doktorantka opisuje metody stosowane w pracy z kwasami nukleinowymi i białkami. Rozdział kończy szczegółowy opis zastosowanych metod behawioralnych, barwień immunofluorescencyjnych, technik mikroskopowych oraz używanych testów statystycznych. Dla lepszego zrozumienia stosowanych technik zostały załączone bardzo dobrze wykonane ryciny.

Wyniki obejmują blisko 36 stron wydruku i są bogato ilustrowane wieloma czytelnymi, kolorowymi rycinami ze szczegółowymi opisami, niezależnie od odpowiednich fragmentów tekstu. Doktorantka wykazała, iż mutanty homozygotyczne charakteryzują się istotnymi zmianami aktywności lokomotorycznej, wynikającej z pobudzenia szlaku mTORC1. Na bazie wyników otrzymanych po zastosowaniu wigabatryny Doktorantka zakłada, że wywołane przez ten lek przeciwpadaczkowy zmiany w aktywności lokomotorycznej mogą być traktowane jako działanie przeciwdrgawkowe. Ponadto homozygotyczne mutanty

wykazywały objawy lęku i zaburzeń kognitywnych. Efekty lękowe zostały potwierdzone wzrostem stężenia kortyzolu w próbkach pobranych z larw. Badania morfologiczne udowodniły nieprawidłowości w spoidle przednim mózgu oraz zaburzony wzrost aksonów na skutek pierwotnych zmian na poziomie molekularnym. Weryfikacja otrzymanych rezultatów za pomocą inhibitora mTOR, rapamycyny, wykazała, iż odwracała ona fenotypy behawioralne charakterystyczne dla homozygotycznych mutantów oraz osłabiała zmiany neuroanatomiczne w spoidle przednim. Lek przeciwpadaczkowy, wigabatryna, osłabiał, zdaniem Doktorantki, zaburzenia lokomotoryczne tożsame z aktywnością drgawkową ale nie zmieniał składowych lokomotorycznych powiązanych z lękiem. Efekt taki wywierała natomiast substancja ANA-12 (antagonista receptorów TrkB), który także neutralizował zmiany neuroanatomiczne w obrębie spoidła przedniego mózgu.

Rozdział Dyskusja został opracowany na blisko 19 stronach wydruku i został podzielony na kilka podrozdziałów układających się w logiczną całość. Doktorantka z powodzeniem udowadnia, iż badane przez nią homozygotyczne zmutowane larwy danio przegowanego mogą być uznane za model stwardnienia guzowego. Na taką interpretację uzyskanych wyników pozwalają dane behawioralne, neuroanatomiczne i molekularne. Należy podkreślić, iż na potrzeby dyskusji przywoływane są dane z opublikowanej przez Doktorantkę pracy w renomowanym czasopiśmie Proc. Natnl. Acad. Sci USA w roku 2020. W pracy tej wykazano, iż w palium mutantów dochodzi do zwiększonego pobudzenia kinazy mTORC1, co dodatkowo uwiarygadnia zmutowane larwy jako zwierzęcy model stwardnienia guzowego. Doktorantka bardzo dobrze poradziła sobie z faktem, iż warunkach klinicznych mamy do czynienia z osobnikami heterozygotycznymi. Dodatkowo także dyskutuje problem mozaicyzmu somatycznego. Szczególnie ważny jest fakt, że larwy heterozygotyczne wykazują znacznie mniejsze odchylenia od normy w porównaniu z homozygotycznymi i, co istotne, w modelach mysich i szczurzych również zmutowane osobniki heterozygotyczne są

odległe od wielu aspektów stwardnienia guzowatego. Biorąc pod uwagę fakt, iż mutacja homozygotyczna u ssaków jest letalna, zdaniem Doktorantki model homozygotyczny wypracowany na bazie larw danio przegowanego oferuje znacznie większe możliwości do badań nad opracowaniem nowych celów molekularnych w leczeniu tej choroby. W dalszej części Dyskusji Doktorantka krytycznie analizuje objawy obniżonej lokomocji jako możliwe napady akinetyczne. Kluczowy według Niej jest pozytywny wpływ wigabatryny. Natomiast ten lek przeciwpadaczkowy nie wpłynął na hiperaktywność motoryczną, co mogłoby wskazywać na brak związku tego objawu z aktywnością drgawkową. Podczas analizy behawioralnej zmutowanych larw Doktorantka słusznie wskazuje na ewidentne wyniki w teście otwartego pola oraz podczas zmian oświetlenia. Kolejne części Dyskusji zajmują problemy równowagi pomiędzy neuroprzekaznictwem pobudzającym i hamującym i Doktorantka w oparciu o wyniki własne i piśmiennictwo dochodzi do wniosku, iż u zmutowanych larw występuje deficyt hamowania synaptycznego. Bardzo ciekawe jest omówienie wyników działania wigabatryny pod kątem braku jej wpływu na aktywność mTORC1. Z drugiej strony rapamycyna hamująca aktywność mTORC1 zapobiegała powstawaniu fenotypów wykazujących objawy lęku. Omawiając substancję ANA-12 (antagonista receptora TrkB) i jej pozytywny wpływ na objawy lęku Doktorantka słusznie wskazuje na udział szlaku sygnałowego BDNF/TrkB w tym efekcie. Nie dziwi więc wniosek, iż receptor TrkB może być potencjalnym celem molekularnym do zwalczania lęku w stwardnieniu guzowatym. Pozostałe wnioski w liczbie czterech są podsumowaniem uzyskanych wyników.

Po zapoznaniu się z tą interesującą rozprawą doktorską nasunęło mi się kilka uwag.

Uwaga główna:

Zważywszy na fakt, że u pacjentów ze stwardnieniem guzowatym znaczny odsetek (powyżej 50%) pacjentów ma napady lekooporne, takiej sytuacji nie można wykluczyć w

badanym modelu (być może z tego wynikałby brak działania wigabatryny). Z drugiej strony u pacjentów ze stwardnieniem guzowatym mogą być obserwowane napady ogniskowe oraz toniczno-kloniczne (a więc nie tylko atoniczne). Dlatego też poddałbym dodatkowej analizie zachowanie danio pręgowanego w napadach drgawkowych wywołanych np. pentetrazolem i porównał do zachowań obserwowanych w badanym modelu.

Pozostałe uwagi:

1. Sformułowania: „balans w neurotransmisji” (str. 32), „lek antypadaczkowy” (str. 115) nie brzmią najlepiej.
2. Str. 33: „... w ekspresji receptorów dla GABA<sub>A</sub>”. Powinno być „...w ekspresji receptorów GABA<sub>A</sub>”.
3. Str. 88: Przesunięcie przez wigabatrynę preferencji zmutowany larw w stronę warunków ciemności trudno jest moim zdaniem tłumaczyć niepożądanym efektem tego leku na układ wzrokowy. W przywołanej pozycji piśmiennictwa lek ten stosowano u myszy przez miesiąc, co nie jest kompatybilne z metodyką stosowaną w rozprawie.
4. Str. 109: stwierdzenie o podwyższonym poziomie mRNA, który nie jest istotny statystycznie sprowadza się do faktu, iż nie obserwowano istotnego podwyższenia poziomu mRNA.
5. Sposób przedstawienia piśmiennictwa pozostawia wiele do życzenia. Szereg pozycji nie zawiera numerycznych danych bibliograficznych (numeru tomu i stron). Można odnieść wrażenie, iż do rozprawy została dołączona pierwotna wersja piśmiennictwa.

Powyższa uwaga główna ma charakter dyskusyjny i nie wpływa na wysoki poziom merytoryczny ocenianej przez mnie rozprawy. Pozostałe uwagi (poza uwagą trzecią) mają charakter techniczny.

W posumowaniu stwierdzam, iż przedłożona do oceny rozprawa doktorska jest wartościową, oryginalną pracą naukową. Posiada niezaprzeczalne walory poznawcze a także

niesie ze sobą potencjał praktyczny, co jasno wynika z przeprowadzonej wstępnej oceny substancji ANA-12. Doktorantka wykazała się szeroką znajomością tematu i zagadnień dotyczących stwardnienia guzowatego w odniesieniu do modeli zwierzęcych i objawów klinicznych. Szczególnie Dyskusja świadczy o bardzo dobrym przygotowaniu Doktorantki do krytycznej analizy uzyskanych wyników. Pozostałe rozdziały rozprawy nie budzą moich istotnych zastrzeżeń. Wnoszę zatem o dopuszczenie mgr Magdaleny Kędry do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

KIEROWNIK  
Katedry i Zakładu Falioterapii  
Uniwersytetu Medycznego w Lublinie  
*Prof. dr hab. Stanisław Czuczaj*

Lublin, 2022-02-07



Warszawa, 01/03/2022

## RECENZJA

Rozprawy Doktorskiej mgr Magdaleny Kędry p.t.

Charakterystyka zmian molekularnych, neuroanatomicznych oraz behawioralnych w modelu stwardnienia guzowatego w danio pręgowanym *tsc2<sup>vu242/vu242</sup>*

Mgr Magdalena Kędra zrealizowała projekt doktorski w Międzynarodowym Instytucie Biologii Molekularnej i Komórkowej pod kierunkiem prof. Jacka Jaworskiego. Przedstawiona mi do oceny Rozprawa opisuje te badania i płynące z nich wnioski.

Celem badań było opracowanie modelu stwardnienia guzowatego opartego na danio pręgowanym. Stwardnienie guzowate jest rzadką wielonarządową chorobą rozwojową, której głównym objawem są liczne guzy w różnych narządach i tkankach. U chorych występują także zaburzenia neurologiczne i neuropsychiatryczne. Przyczyną choroby jest mutacja w jednym z genów *TSC* kodujących białka, które hamują kinazę mTOR. Ścieżka sygnałowa mTOR reguluje z kolei cały szereg podstawowych funkcji komórkowych. W układzie nerwowym jej aktywność wpływa na różnicowanie i migrację neuronów, wzrost wypustek nerwowych, synaptogenezę i działanie synaps, prowadząc do wspomnianych zaburzeń centralnego układu nerwowego. Leczenie choroby polega na hamowaniu kinazy mTOR rapamycyną i jej pochodnymi, a w przypadku dzieci z napadami epileptycznymi - inhibitorem metabolizmu GABA wigabatryną. Oba typy leków powodują poważnie efekty uboczne, co ogranicza ich stosowanie. Do rozwoju nowych terapii zaburzeń centralnego układu nerwowego w stwardnieniu guzowatym mogłoby się przyczynić farmakologiczne testy przesiewowe, do tej pory jednak brakowało dobrego modelu do takich testów. W ostatnich latach rośnie popularność ryby z gatunku danio pręgowanego jako organizmu modelowego do badań farmakologicznych ze względu na możliwość podawania niskocząsteczkowych związków prosto do wody i niski koszt hodowli. W zamyśle Doktorantki danio pręgowany z mutacją typu nonsens w genie *tsc2* (*tsc2<sup>vu242/vu242</sup>*), model znany od 10 lat, mógłby służyć do badania

patogenezy zaburzeń neurologicznych i neuropsychiatrycznych w stwardnieniu guzowatym i testowania środków farmakologicznych. Do tej pory nie było to jednak możliwe, ponieważ nie scharakteryzowano tego modelu pod kątem zmian w mózgu i w behawiorze, które przypominałyby zaburzenia u ludzi. Cel i zadania, które postawiła przed sobą Doktorantka, polegające na identyfikacji takich zaburzeń i wstępnym przetestowaniu modelu w teście farmakologicznym, były więc bardzo dobrze uzasadnione.

Doktorantka przeprowadziła kompleksowe badania, które objęły poziom komórkowy, anatomiczny i behawioralny. Metody, które zastosowała, były adekwatne, nowoczesne (m.in. digital droplet PCR i mikroskopia lightsheet) i zostały dobrze opisane. Eksperymenty zaprojektowała i zanalizowała bez zarzutu. Wnioskowanie poprzedziła solidną analizą ilościową oraz dobrze dobraną statystyczną analizą wyników. Do pokazania wyników zastosowała dwa typy wykresów. Mam tu pewne zastrzeżenia do wykresów słupkowych, ponieważ poza średnią pokazano na nich standardowy błąd średniej (SEM), zamiast odchylenia standardowego (SD), gubiąc w ten sposób informację o rozrzucie wyników. Czy było jakieś uzasadnienie dla takiej formy przedstawienia danych? Natomiast doceniam wykresy pudełkowe, które poza średnią i odchyleniem pokazują rozkład badanej cechy, dając czytelnikowi najpełniejszy obraz.

Merytorycznie oceniam pracę wysoko. Wyniki i konkluzje są w większości przekonujące. Dyskutowałabym z interpretacją obniżonej aktywności larw danio jako prawdopodobnego przejawu napadów epileptycznych (str. 83 i 130). Miałoby o tym świadczyć zwiększenie czasu aktywności po zastosowaniu wigabatryny, ponieważ lek ten stosowany jest w epilepsji. Nie jest to błędne, ale formułowałabym wniosek ostrożniej niż konkluzja, że danio przegowany *tsc2<sup>vu242/vu242</sup>* „wykazuje fenotypy behawioralne podobne do epilepsji”, chyba że wniosek oparty jest nie tylko na wynikach z doktoratu. Konkluzja o zaburzonych funkcjach poznawczych też jest na wyrost. Pomimo tego mojego sceptycyzmu, nie mam wątpliwości, że Doktorantka potwierdziła wystąpienie podobieństw pomiędzy badanym modelem a patologiami centralnego układu nerwowego występującymi u pacjentów ze stwardnieniem guzowatym: m.in. zaburzenie szlaków transmisji hamującej i prawdopodobną epilepsję, niedorozwinięcie wiązek aksonów łączących półkule mózgu, zaburzenia lękowe. Uważam, że praca jest ważnym krokiem w rozwoju modeli stwardnienia guzowatego, bo właściwie dopiero teraz można mówić o fenotypie neuronalnym u ryb danio *tsc2<sup>vu242/vu242</sup>* przypominającym zaburzenia neurologiczne i neuropsychiatryczne u pacjentów. Wartość pracy podnosi walidacja zastosowania modelu do testów farmakologicznych. Doktorantka przeprowadziła ją traktując danio rapamycyną i wigabatryną, czyli klasycznymi lekami stosowanymi w stwardnieniu

guzowatym, i stwierdzając poprawę niektórych parametrów. Co więcej, wykazała korzystne działanie związku ANA-12, antagonisty receptora dla BDNF o nieznanym wcześniej działaniu terapeutycznym. Podsumowując - cel badań został osiągnięty. W ramach pracy doktorskiej powstało narzędzie badawcze, którego do tej pory brakowało.

Mam kilka uwag krytycznych do interpretacji anatomicznych. Po pierwsze, przestarzałe jest zaliczanie podwzgórza do międzymózgowia (str. 40), ponieważ w przyjmowanym obecnie modelu prosomerowym Puellesa i Rubensteina z 1993 podwzgórze rozwija się z części cewki nerwowej, z której powstaje kresomózgowie. Druga uwaga dotyczy identyfikacji części mózgu z komórkami Gad65/67-pozytywnymi jako kresomózgowia (ryc. 4.16), a konkretnie pallium (str. 124). To nie wydaje mi się prawidłowe, bo w tym wieku w pallium dopiero zaczynają się pojawiać komórki GABAergiczne. Czy nie są to opuszki węchowe? W zorientowaniu się pomogłoby tutaj barwienie kontrastowe uwidoczniające anatomię mózgu oraz schemat płaszczyzny i głębokości sekcji. Ostatnia uwaga dotyczy uzdeczek, które, jak słusznie zauważa Doktorantka, są u danio pręgowanego asymetryczne (str. 40/41, 117). Stwierdzenie, że uzdeczka są większe po lewej stronie jest jednak nie do końca prawdziwe, bo asymetria uzdeczek nie polega na różnej wielkości całej struktury, ale na asymetrii w obrębie części grzbietowej, której jądro boczne jest większe po lewej stronie a przyśrodkowe po prawej. Różnica w wielkości uzdeczek pokazana w barwieniu beta-tubuliny (ryc. 5.1) nie jest przekonująca, bo barwienie to pokazuje przecież połączenia, a nie strukturę. Asymetrię, lub jej brak, można by było stwierdzić dopiero na podstawie barwienia różnicującego wspomniane jądra. Zresztą sama Doktorantka potraktowała ten wynik jako wstępny i zamieściła go sekcji Dyskusja. Wymienione uwagi nie zmieniają generalnych wniosków i nie wpływają na ocenę wartość pracy, ponieważ dotyczą kwestii pobocznych.

Jeżeli chodzi o stronę formalną pracy, Rozprawa ma układ tradycyjny z dobrymi proporcjami poszczególnych części. Bibliografia liczy 333 pozycje, i warto podkreślić że 30% stanowią pozycje z ostatnich 5 lat, co świadczy o dobrej znajomości literatury. Tekst jest napisany jasnym i precyzyjnym językiem. Edycja Rozprawy jest bardzo staranna. Natomiast zapis bibliograficzny jest niepełny dla wielu cytowanych pozycji. Np. spośród pierwszych 20 pozycji tylko połowa ma pełny opis. W pozostałych brakuje numerów stron (pozycja 1, 6, 7, 13, 17) lub numerów tomów (5, 18 i 19) i niekonsekwentnie podawany jest numer czasopisma (12, 15, 17). Podobnie jest w całej bibliografii. Podejrzewam, że nie zadziałał prawidłowo program do wstawiania cytacji, co zostało przez Doktorantkę przeoczone mimo widocznej w całej Rozprawie staranności.

Na koniec recenzji chcę dodać kilka słów uznania na temat Wstępu i Dyskusji. Wstęp jest dosyć nietypowy, bo mimo że zawiera wszystkie potrzebne informacje nie jest najczęściej spotykanym kompendium wiedzy na tematy ogólnie związane projektem. Tutaj treści zostały bardzo świadomie wyselekcjonowane i konsekwentnie zmierzają do postawienia problemu. Taka forma wymaga dogłębnego zrozumienia i przemyślenia tematyki. Dyskusja, bardzo zresztą ciekawa, jest także skupiona na tym, co dla projektu najważniejsze, czyli ocenie opracowanego modelu, jego mocnych stron i ograniczeń.

Podsumowując, przeprowadzone w ramach projektu doktorskiego badania są dobrze uzasadnione i prawidłowo przeprowadzone. Ich wyniki niewątpliwie stanowią oryginalny wkład w badania podstawowe i aplikacyjne nad stwardnieniem guzowatym. Stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji Rozprawa Doktorska spełnia warunki określone w stosownych ustawach. Stawiam więc wniosek do Rady Naukowej Instytutu Biologii Doświadczalnej PAN im. M. Nenckiego w Warszawie o dopuszczenie pani mgr Magdaleny Kędry do dalszych etapów przewodu doktorskiego, i jednocześnie wnioskuję o wyróżnienie pracy.