

**Ocena rozprawy doktorskiej pani mgr inż. Anny Głowackiej
w związku z postępowaniem w sprawie nadania stopnia doktora**

Pani mgr inż. Anna Głowacka przedłożyła do Rady Naukowej Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN w formie manuskryptu rozprawę doktorską pt. „Stymulacja neuronalnej nadprodukcji BDNF w uszkodzonym rdzeniu kręgowym szczura; ocena zmian molekularnych i morfologicznych w okresie najlepszej poprawy funkcjonalnej”. Promotorem rozprawy jest pani prof. dr hab. Małgorzata Skup, zaś promotorem pomocniczym pani dr Olga Gajewska-Woźniak. Jak wynika z dokumentacji postępowanie toczy się w oparciu o przepisy Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2023 r. poz. 742 z późn. zm.) Badania będące przedmiotem rozprawy zostały przeprowadzone przy wsparciu finansowym trzech projektów badawczych: projektu Opus 16 2018/31/B/NZ4/02789 i projektu Opus 5 2013/09/B/NZ4/03306 (kierownik: prof. dr hab. Małgorzata Skup) oraz projektu Preludium 19 2020/37/N/NZ4/04136 (którego kierownikiem była doktorantka). Posiadanie własnego projektu zdobytego w trybie konkursowym jest bardzo dużym osiągnięciem, świadczącym o umiejętności planowania badań.

Uwagi ogólne

Rozprawa doktorska jest klasyczną, eksperymentalną pracą, której głównym celem była ocena komórkowych i molekularnych mechanizmów terapeutycznego działania BDNF w zakresie poprawy lokomotorycznej po całkowitym przecięciu rdzenia, co prawidłowo precyzuje tytuł pracy. Układ rozprawy jest standardowy tj. z podziałem na wstęp, opis materiału badawczego i metod, wyniki oraz dyskusję, a także zawiera streszczenie w języku polskim i angielskim oraz spis piśmiennictwa. Nietypowy dla rozpraw jest spis publikacji własnych, zamieszczony na końcu pracy. Spis ten wskazuje na znaczący dorobek pani Głowackiej, która jest autorem 5 publikacji, a w jednej z nich jest pierwszym autorem. Nie mam zastrzeżeń do układu rozprawy i należy stwierdzić, że sam manuskrypt jest

przygotowany starannie, zgodnie z kanonami przygotowania rozpraw naukowych. Tekst rozprawy obejmuje 110 stron co jest standardową objętością eksperymentalnych rozpraw doktorskich.

Wprowadzenie do rozprawy obejmujące 12 stron, jest starannie przygotowane i wskazuje na znaczącą wiedzę doktorantki w zakresie: sieci neuronalnej rdzenia kręgowego, budowy i funkcji synaps nerwowo-mięśniowych, skutków uszkodzeń rdzenia kręgowego oraz funkcji i znaczenia BDNF w terapii uszkodzeń ośrodkowego układu, natomiast ostatnia część wprowadzenia dotyczy wirusów AVV wykorzystywanych w terapiach genowych – w transferze genu BDNF. Treść tych rozdziałów ma związek z tematyką opisywanych w zasadniczej części rozprawy doświadczeń i dlatego uważam, że jest właściwie dobrana i opracowana oraz poparta poprawnym przeglądem literatury. Zabrakło mi jednak podrozdziału z dokładniejszą charakterystyką (budowy zarówno pod względem typu włókien mięśniowych i jednostek ruchowych) mięśni: piszczelowy przedni (TA) i płaszczkowaty (Sol) szczura, których zarówno motoneurony, jak i złącza nerwowo-mięśniowe były obiektami badań doktorantki, a których budowa jest już dokładnie poznana. W tej części dostrzegłam także kilka niezręczności językowych, jak np. na str. 17 „włókna szybkie o dużej męczliwości” i na str. 22 „męczliwych mięśni u ludzi” gdzie właściwszym określeniem dot. zmęczenia jest „odporny” lub „nieodporny” na zmęczenie; zdanie na str. 22 „Utrzymuje morfologię i funkcje neuronów, zapobiega zanikowi, moduluje regenerację aksonalną i plastyczność ...” gdzie nie bardzo wiadomo o zaniku czego Autorka pisze i kolejne zdanie na str. 22 „Ekspresja receptora BDNF o wysokim powinowactwie TrkB również wzrasta po ćwiczeniu” („po treningu” lub „po aktywności fizycznej” wydaje się być właściwsze). Nie są to oczywiście poważne błędy, a całość wstępu napisana jest zrozumiałym językiem co nie jest łatwe w przypadku tekstu naukowego.

Wstęp kończy się określeniem założeń i celów pracy, które w moim przekonaniu mają znaczący stopień nowatorstwa dotyczący wpływu BDNF na utrzymanie funkcjonalności synaps nerwowo-mięśniowych w szczurzym modelu całkowitego przecięcia rdzenia kręgowego.

Opis materiału i metod badawczych zajmuje 32 strony, co odpowiada bardzo szerokiemu spektrum stosowanych (około 20) różnych metod m.in. technik chirurgicznych, badań behawioralnych, technik histo- i immunohistochemicznych, mikroskopii elektronowej i

konfokalnej. Wskazuje to na ogromny warsztat naukowy pani Głowackiej i spore doświadczenie laboratoryjne. Doktorantka uczciwie zaznacza, że część z nich jest efektem współpracy innych eksperymentatorów z zespołu badawczego, w którym realizowała swój projekt, co w niczym nie umniejsza zasług doktorantki, a jest standardowym postępowaniem w zespołach laboratoryjnych, umożliwiającym pełniejsze wykorzystanie potencjału naukowego. Uważam, że stopień szczegółowości opisu metod jest wyczerpujący i wystarczający w sensie umożliwienia powtórzenia badań przez inny zespół. Język jakim posługuje się doktorantka jest poprawny i typowy dla tekstów naukowych. Do tej części rozprawy nie mam większych uwag krytycznych. Zaznaczę jedynie brak doprecyzowania, że domięśniowe iniekcje barwników i następnie pozyskiwanie materiału tkankowego poprzez wypreparowanie mięśni odbywały się w obu tylnych łapach zwierząt. Procedury postępowania ze zwierzętami były zgodne z wytycznymi Dyrektyw UE oraz polskiej Ustawy o Ochronie Zwierząt. Badania uzyskały akceptację Pierwszej Lokalnej Komisji Etycznej ds. doświadczeń na zwierzętach w Warszawie.

Wyniki badań są opisane w sposób standardowy dla rozpraw doktorskich i cechują się znacznie większym stopniem szczegółowości, niż w publikacjach zawartych w czasopismach naukowych. Zgodnie z charakterem metod, opis wyników podzielony jest na kilka zasadniczych części, obejmujących kolejno badania behawioralne, a następnie głównie wyniki doświadczeń z zakresu wpływu rdzeniowej nadekspresji BDNF na motoneurony oraz złącza nerwowo-mięśniowe. Pragnąc wskazać najważniejsze wyniki pani mgr inż. Głowackiej należy wymienić, że rozprawa przedstawia szczegółową charakterystykę lokomocji szczurów po spinalizacji i rdzeniowej iniekcji AAV-BDNF oraz, co jest największym *novum* tej pracy, charakterystykę zmian w strukturze i ultrastrukturze synaps nerwowo-mięśniowych mięśni TA i Sol wraz ze wskazaniem różnic w odpowiedzi obwodów ruchowych obu mięśni. Coraz częściej stosuje się kilka podejść eksperymentalnych do badania zmian we właściwościach mięśni szkieletowych i właściwościach neuronów ruchowych wynikających z przecięcia rdzenia kręgowego. Autorka poszła o krok dalej, przeprowadziła badania i opisuje wyniki dotyczące potencjału terapeutycznego wektora AAV-BDNF łagodzącego skutki uszkodzenia rdzenia kręgowego. Uważam, że jest to bardzo cenne i w istotny sposób poszerzające wiedzę na temat mechanizmu działania neurotrofiny BDNF jako terapii odwracającej skutki urazu rdzenia kręgowego. Oceniając rozprawę chciałabym podkreślić, że z uznaniem należy docenić ogromną ilość wyników badań, ich bardzo szczegółowy stopień

opracowania, czytelne ryciny, prawidłowo dobraną statystykę, komplementarność dającą spory obraz zmian jakie następują po zastosowaniu iniekcji neurotrofiny BDNF w następstwie uszkodzenia rdzenia kręgowego, który powoduje trwałą dysfunkcję motoryczno-sensoryczną z powodu przerwania obwodów neuronalnych kontrolujących aktywność jednostek motorycznych.

W czasie lektury wyników dostrzegłam dość niefortunne zdanie na str. 85 „... z dużo wyższą ekspresją w mięśniach Sol (proszę podać wartości i rozrzuty).” Natomiast opis ryciny 16.W oraz zdanie na str. 79 „...i ocenić mielinizację dystalnych odcinków nerwów wchodzących do włókna mięśniowego.” dotyczą najprawdopodobniej oceny mielinizacji włókien nerwowych (aksonów), które tworzą synapsy na włóknach mięśniowych, a nie całego nerwu.

Do tekstu dyskusji rozprawy nie mam większych zastrzeżeń. Sposób prowadzenia dyskusji i wnioskowania jest logiczny i poparty źródłowymi danymi ze światowego piśmiennictwa z ostatnich lat, co wskazuje, że badania opisane w rozprawie dobrze wpisują się w nurt aktualnie realizowanych badań nad skutkami uszkodzeń ośrodkowego układu nerwowego. Ewentualne wątpliwości i pytania, które nasuwają się po przeczytaniu rozprawy wyjaśnia ostatni rozdział dyskusji: „Ograniczenia metodologiczne pracy i proponowany kierunek badań”, który również stanowi dowód na dojrzałość naukową doktorantki. Wnioski końcowe umieszczone po zakończeniu dyskusji nie są podsumowaniem wyników, ale wskazaniem mechanizmów mających wpływ na poprawę funkcjonalną zwierząt po dordzeniowej iniekcji AAV-BDNF. Zabrakło spójnej konkluzji wyników na koniec dyskusji, chociaż podsumowaniem pracy wydają się być trzy pierwsze akapity tego rozdziału. Chciałabym odnieść się do początku dyskusji właśnie i proszę Autorkę o rozszerzenie podczas obrony wątku wskazującego, że BDNF działa selektywnie. Może należałoby jasno konkludować, że na terapię neurotrofiną BDNF odpowiadają w większym stopniu włókna mięśniowe wolno kurczące się (typ I) niezależnie od typu mięśnia, a że mięsień TA szczura zawiera zaledwie ok. 2% włókien wolno kurczących się, a mięsień Sol ok. 87% (Staron et al., 1999), stąd obserwowane różnice w odpowiedzi pomiędzy badanymi mięśniami? Rozpatrując dane dotyczące aktywności jednostek ruchowych w mięśniach szczura (Hennig i Lomo 1985) warto wziąć pod uwagę fakt, że zapewne dla wszystkich jednostek w mięśniu SOL następuje po uszkodzeniu rdzenia kręgowego bardzo radykalny spadek aktywności (z 5-8 godzin na dobę), natomiast część jednostek szybkich – zwłaszcza typu FF cechuje się niewielką

aktywnością, której czas mierzony jest w czasie doby w sekundach (lub w ogóle nie są aktywowane podczas swobodnego poruszania się szczura w klatce), stąd uszkodzenie rdzenia kręgowego w zasadzie powoduje bardzo niewielką zmianę aktywności – lub nawet nie powoduje zmiany.

W odniesieniu do tej części rozprawy chcę zwrócić uwagę na drobne uchybienia nazewnicze. Na str. 89 i 96 użyte są określenia „szybkokurczliwych”, „wolnokurczliwych” a powinno się używać określenia „szybko kurczące się”, „wolno kurczące się”

Z obowiązku recenzenta chciałabym również, w odniesieniu do całej rozprawy, zwrócić uwagę na błędy interpunkcyjne w postaci niestosowania przecinków np. przed słowem „który” (np. str. 25, 26) oraz umieszczaniu przecinka po takich słowach jak „ponadto” (np. str. 68, 75, 96), co w języku polskim jest błędem wynikającym bardzo często z wpływu języka angielskiego (nauczeni jesteśmy stawiać przecinki po analogicznych wyrażeniach np. „moreover”). Natomiast w wykazie użytych skrótów brakuje receptorów TrkB i p75 oraz mięśni TA i Sol. Niezależnie od kilku powyższych uwag, stwierdzam, że rozprawa jest profesjonalnie przygotowana, a wszelkie uchybienia mają charakter trudnych do uniknięcia błędów, które w żaden sposób nie stanowią o umniejszeniu wartości merytorycznej pracy.

Podsumowanie

Konkludując ostatecznie recenzję rozprawy doktorskiej pani mgr inż. Anny Głowackiej uważam, że rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2023 r. poz. 742 z późn. zm.) Stwierdzenie to wynika z wysokiego poziomu naukowego prowadzonych badań, ich znaczącego stopnia nowatorstwa, wykorzystania w badaniach szeregu komplementarnych technik laboratoryjnych i bardzo wysokiego poziomu samej rozprawy. W związku z powyższym, wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Biologii Doświadczalnej o dopuszczenie mgr inż. Anny Głowackiej do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora. Mając na uwadze wysoką wartość merytoryczną pracy, wnioskuję o jej wyróżnienie.

Poznań, 10. 02. 2024

Ilona Dymowska - Celichowska

Prof. dr n.med. Joanna Lewin-Kowalik
Katedra i Zakład Fizjologii
Śląskiego Uniwersytetu Medycznego
W Katowicach

Katowice 16.02.2024

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr inż. Anny Głowackiej „ Stymulacja neuronalnej nadprodukcji BDNF w uszkodzonym rdzeniu kręgowym szczura; ocena zmian molekularnych i morfologicznych w okresie najlepszej poprawy funkcjonalnej”

W ostatnich dekadach dokonał się znaczący postęp w zrozumieniu mechanizmów uczestniczących w pourazowych zmianach w OUN pozwalający na poszukiwanie strategii terapeutycznych przywracających lub zastępujących utracone funkcje. Ciągłe jednak w wielu sytuacjach klinicznych medycyna jest bezsilna i dostępne narzędzia farmakologiczne, neurochirurgiczne i rehabilitacyjne nie są w stanie zniwelować skutków działania czynników uszkodzających. Szczególne miejsce na tej skali niemożności terapeutycznej zajmują urazy i uszkodzenia rdzenia kręgowego, w którym ze względu na jego szczególną kablową strukturę możliwość kompensacyjnego przejmowania utraconych funkcji przez struktury sąsiadujące, co ma czasami miejsce w innych okolicach OUN, jest bardzo ograniczona. Wiadomo jednak, że ośrodki rdzeniowe zaangażowane w sterowanie ruchem z jednej strony charakteryzują się, zwłaszcza u gryzoni, dość znaczną autonomią z drugiej zaś odcięte na skutek urazu od wpływów struktur nadrdzeniowych nie są w stanie zapewnić spontanicznie efektywnej lokomocji. Opracowanie metod pozwalających na podjęcie po urazie wydajnego funkcjonowania rdzeniowych generatorów ruchu wraz ze stwierdzeniem jak reagują na ten nowy stan funkcjonalny struktury efektorowe, jest niewątpliwie racjonalną strategią badawczą.

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr inż. Anny Głowackiej „Stymulacja neuronalnej nadprodukcji BDNF w uszkodzonym rdzeniu kręgowym szczura; ocena zmian molekularnych i morfologicznych w okresie najlepszej poprawy” jest opracowaniem zawierającym opis precyzyjnie zaplanowanych badań wykonanych w zespole badawczym o ogromnym doświadczeniu i osiągnięciach w tej dziedzinie. Praca wraz z bibliografią liczy 109 co świadczy o zwięzłości rozprawy, choć z drugiej strony wrażenie takie może być spotęgowane użyciem mniejszej niż zwykle czcionki oraz częstymi akapitami z interlinią 1 wiersza (podpisy pod rycinami, bibliografia).

Praca skonstruowana jest w sposób typowy składa się bowiem z następujących części: streszczenie w języku polskim i angielskim, wstęp nazwany przez Autorkę wprowadzeniem oraz założenia i cele pracy, materiały i metody, wyniki, dyskusja, wnioski końcowe, bibliografia i na końcu spis publikacji własnych Autorki. Oczywiście każdy z przedstawionych rozdziałów podzielony jest na stosowne podrozdziały odnoszące się do poszczególnych szczegółowych zagadnień. Na samym początku, przed streszczeniem został zamieszczony wykaz użytych skrótów, co jest bardzo rozsądne, gdyż przygotowuje czytelnika do rzetelnego zapoznania się z tekstem.

Wprowadzenie liczące 12 stron przedstawia na wstępie kluczowe informacje dotyczące kontroli zachowania ruchowego zwierząt z uwzględnieniem roli ośrodkowych generatorów wzorca lokomocji oraz złącza nerwowo-mięśniowego i włókien mięśniowych. Następny podrozdział to zwięzłe przedstawienie wiedzy na temat urazów rdzenia kręgowego ze szczególnym uwzględnieniem eksperymentalnego modelu całkowitego przecięcia rdzenia kręgowego. Na szczególną uwagę zasługuje przegląd danych z piśmiennictwa dotyczących zmian w funkcji i morfologii zarówno w obrębie rdzenia jak i złącza nerwowo-mięśniowego, komórek glejowych oraz włókien mięśniowych. Kolejnym obiektem rozważań Autorki jest BDNF, a zwłaszcza jego znaczenie w układzie ruchowym oraz efektywność terapeutyczna różnych dróg aplikacji tej neurotrofiny w terapii skutków uszkodzeń

rdzenia kręgowego w modelu zwierzęcym. Odnosząc się do wcześniejszych badań rodzimego zespołu Autorka wskazuje, że okres najlepszej poprawy funkcjonalnej to trzeci tydzień po uszkodzeniu a następnie wywołaniu nadekspresji BDNF, co moim zdaniem jest raczej rokowaniem niekorzystnym dla potencjalnej efektywnej terapii. Sądzę, że powyższa obserwacja skłoniła Doktorantkę do skrócenia czasu obserwacji efektów nadekspresji BDNF w niniejszym badaniu do około 2 tygodni. W ostatnim podrozdziale przekonująco uzasadnia zasadność użycia wektora AAV. Ta część dysertacji, choć niezbyt rozległa, świadczy o dużej wiedzy Doktorantki w trudnym obszarze neurobiologii w jakim przyszło się jej poruszać oraz o umiejętności zwięzłego i precyzyjnego formułowania swoich myśli, co nie jest, niestety, powszechne w debacie naukowej.

W rozdziale „Założenia i cel pracy” Doktorantka na wstępie krótko przywołuje najistotniejsze dla jej badań stwierdzenia, z analizy których wynika, że: nadekspresja BDNF doprowadzi w ciągu dwu tygodni do zmiany receptywności motoneuronów i zwiększy ich aktywność w produkcji neuroprzekazników jak również wywoła działanie neuroprotekcyjne w odniesieniu do synaps nerwowo-mięśniowych. Bardzo ciekawym założeniem jest oczekiwanie różnej odpowiedzi na zastosowane działanie ze strony mięśni prostowników i zginaczy. Opierając się na tych hipotezach przedstawia 4 główne cele swojej pracy, co do treści których mam pewne zastrzeżenia. Uważam, że cel pierwszy czyli potwierdzenie poprawy funkcji ruchowych u zwierząt z całkowitym przecięciem rdzenia, którym podano AAV-BDNF jest bezzasadny, gdyż we wcześniejszych badaniach tego zespołu oraz jak podaje sama Doktorantka grupy Lorne Mendella takie działanie stwierdzono. Nawiasem mówiąc należało zacytować pracę, której pierwszą autorką jest V. S. Boyce a Mendell senior autorem. Myślę, że bardziej fortunne byłoby po prostu stwierdzenie, że do zrealizowania celów 2 i 3 podstawą jest uzyskanie poprawy funkcji motorycznych po zastosowaniu AAV-BDNF w oparciu o wcześniej opracowaną metodę. Oczywiście musi to być adekwatnie metodycznie zweryfikowane, co ma miejsce w niniejszych badaniach. Moje wątpliwości budzi również cel 4, który

jest raczej projektem przyszłej dyskusji, a nie planem konkretnych działań badawczych.

Rozdział „Materiały i metody” jest najobszerniejszą częścią niniejszej dysertacji bowiem liczy 31 stron. Otwiera ten rozdział 5 tabel zawierających spis odczynników, roztworów, zestawów odczynników, materiałów i aparatury zastosowanych do realizacji badań. Generalnie rozdział ten obfituje w tabele, gdyż całościowo jest ich w nim 22. W tabelach tych nie uniknięto zresztą pomyłki, gdyż w tabeli 8M napisano, że sulfadiazyna to antybiotyk, podczas gdy jest to bakteriostatyczny sulfonamid w tym preparacie podawany z trimetoprimem, co jest częstą praktyką. Wracając do głównego tematu rozdziału w następnym podrozdziale opisana jest metoda hodowli *in vitro* służącej potwierdzeniu skuteczności transfekcji oraz pozyskiwaniu z niej materiału badawczego, a w kolejny opisuje zwierzęta doświadczalne. Badania przeprowadzono na 50 samcach Wistar dzieląc zwierzęta na 7 grup o różnej liczebności. Dwie grupy (razem 18 zwierząt) to jak pisze Autorka „kontrolne naiwne” co po polsku brzmi dziwacznie, a na dodatek z tabeli wynika, że są to zwierzęta, u których nie tylko nie wykonano iniekcji dordzeniowych, ale także nie wykonano uszkodzenia rdzenia. Czyli można domniemywać, że pozostałe grupy z uszkodzeniem rdzenia i iniekcjami dordzeniowymi porównywano z najliczniejszą grupą całkowicie zdrowych zwierząt. W tekście tylko raz spotkałam się z opisem preparatu pochodzącego od zwierzęcia kontrolnego w Ryc.14W. Proszę zatem o wyjaśnienie jaki był cel i zakres badań dokonanych na 18 zwierzętach z grup „kontrolne naiwne” ponieważ z tabeli wynika, że były to zarówno badania morfologiczne jak i badania ekspresji genów, oraz jak wykorzystano otrzymane wyniki.

W opisie osławiania zwierząt napisano, że osławiano zwierzęta z eksperymentatorem i bieżnikiem, lecz z dalszego opisu wynika, że nie analizowano motoryki zwierząt przed zabiegami uszkodzenia rdzenia. Moim zdaniem takie działanie dałoby dokładniejszy wgląd w zmiany motoryki po transfekcji, wiadomo bowiem, że

mino zakładanej identyczności nie wszystkie zwierzęta tego samego szczepu mają i takie same „zdolności i chęci” do wykonywania zadań ruchowych.

Jeśli chodzi o domięśniową iniekcję barwników podano, że zwierzętom w ogólnej narkozie wziewnej podawano miejscowo syntetyczny opioidowy środek przeciwbólowy. Chciałabym zapytać, jakie było uzasadnienie takiego działania. Podobnie zresztą jak stosowanie Xylokainy na oponę przed przecięciem rdzenia również u zwierząt w narkozie.

Badania behawioralne dotyczyły lokomocji po terapii i ocena to została wykonana bez zarzutu, zresztą grupa badawcza, w której realizowano te etapy projektu ma ogromne doświadczenie w tego typu testach. Poza badaniem poprawy funkcji motorycznych na bieżniku, gdzie jednak stymulująco na funkcjonowanie generatora wpływają sygnały z pobudzanych nocyceptorów, mechanoreceptorów tym proprioreceptorów, na mnie największe wrażenie zrobił opis swobodnych niewymuszonych zachowań ruchowych w otwartym polu. Zwierzęta po iniekcji AAV-BDNF wykazywały ruchy tylnych kończyn ze stopami stawianymi na powierzchni podszwowej oraz okazjonalnymi alteracjami, a kilka z nich było w stanie utrzymać ciało symetrycznie do osi ruchu przez długi czas. Sugerowałabym w następnym etapie pogłębić poszukiwanie mechanizmów, które na to pozwoliły, bo model uszkodzenia wyklucza jakiegokolwiek wpływy ponadrdzeniowe. Obserwacja ta może być niezwykle ważna z punktu widzenia potencjalnych zastosowań klinicznych.

Mam wątpliwości, jak zawsze, jeśli chodzi o rozumienie badania reakcji na bodziec dotykowy estezjometrem von Freya. Zastosowany bodziec nie był bowiem bodźcem bólowym lecz dotykowym, a badane zjawisko to allodynia.

Jeżeli chodzi o pobierania materiału tkankowego z dystalnego odcinka przeciętego rdzenia to z opisu wynika, że u różnych zwierząt był on pobierany w różnym czasie od urazu, a kryterium terminacji eksperymentu było uzyskanie „największej” poprawy. Skąd zatem eksperymentator wiedział, że u niektórych zwierząt jest to dzień 13 i nie należy dłużej czekać, a u innych czekano do dnia 17 i czy ta zmienność nie wpływa na rzetelność uzyskanych wyników.

Pozyskiwanie materiału tkankowego do analizy mikroskopowej nie budzi wątpliwości jak to ma miejsce w przypadku pobierania do oznaczeń biochemicznych (które Doktorantka z niewiadomych dla mnie przyczyn nazywa doświadczeniami- oznaczanie stężenia czegoś w czymś nie jest doświadczeniem tylko pomiarem). W tym drugim przypadku nie podano jaka była masa pobranych tkanek (pobierano tkankę nerwową) od każdego zwierzęcia, dlaczego pokrojono rdzeń na skrawki grubości 1mm, jak następnie rozdzielano pobrany materiał na potrzeby różnych oznaczeń.

Analizy uzyskanego materiału biologicznego dokonano przy użyciu bardzo wielu nowoczesnych, a niekiedy wręcz nowatorskich, metod adekwatnych do uzyskania odpowiedzi na pytania postawione w celach pracy. Pragnę podkreślić, że jestem pod głębokim wrażeniem zakresu i jakości przeprowadzonych analiz. Rozumiem, że Pani Anna Głowacka nie byłaby w stanie dokonać tego wszystkiego całkowicie samodzielnie, lecz jeżeli w niektórych przypadkach tylko współuczestniczyła w wykonaniu badań, to niewątpliwie jest badaczką doskonale przygotowaną nie tylko do wykonywania bardzo nowoczesnych i skomplikowanych zadań badawczych lecz również może samodzielnie stawiać złożone pytania naukowe.

Wyniki są znaczącą częścią rozprawy liczącą 27 stron co nie dziwi w obliczu ogromu zadań badawczych jakie postawiła sobie Autorka. Rozdział ten został podzielony na 11 podrozdziałów co ukazuje mnogość danych z jaką musiała się zmierzyć. Opis wyników został wzbogacony o 18 rycin, będących prezentacją obrazów mikroskopowych w tym z transmisyjnego mikroskopu elektronowego, a w pozostałych przypadkach są to graficzne przedstawienia analizy wyników w postaci wykresów. Wykresy są sporządzone bardzo starannie z wyraźną dbałością o czytelność. Wyrazem tej dbałości jest również bez wątpienia rycina 13W przedstawiająca bardzo istotne dane dla zrozumienia potencjalnego wpływu transfekcji na motoneurony mięśni płaskowatego i piszczelowego przedniego, w związku z ich lokalizacją w różnych segmentach lędźwiowych rdzenia szczura. W pobliżu tej ryciny na stronie 77 w rycinie 14W zauważyłam jedyny obraz uzyskany z mate-

riału od zwierzęcia kontrolnego przedstawiający złącze nerwowo-mięśniowe w mięśniu piszczelowym przednim. Dokumentacja ta przedstawia zresztą połączenie metody FISH i immunofluorescencji co zasługuje na szczególne wyróżnienie. Wartość dokumentacji fotograficznej podnoszą załączone do niej opisy zawierające istotne informacje niezbędne do prawidłowej analizy obrazu. Jak wspomniałam dokumentacja fotograficzna pochodząca spod mikroskopu jest w większości przypadków bardzo dobrej jakości i wywołuje u czytelnika podziw i uznanie dla profesjonalizmu autorki.

Co oczywiste, następnym rozdziałem jest dyskusja, która rozpoczyna się przywołaniem terapii z użyciem AAV-BDNF co, jak wspomniałam wcześniej, było właściwie punktem wyjścia dla niniejszych badań. W drugim akapicie Autorka podsumowuje wykazane przez Nią różnice w odpowiedzi różnych badanych mięśni i ich synaps nerwowo-mięśniowych na zastosowaną terapię.

Przedstawia również działanie niepożądane transfekcji jakim jest wzrost wrażliwości na bodźce dotykowe. Taka nadwrażliwość wejścia czuciowego bez wątpienia może dezintegrować prawidłowe działanie łańcuchów neuronalnych w generatorach ruchu.

Dyskusja jest dość lakoniczna, ale rzetelna i oparta o najnowsze i adekwatne piśmiennictwo z tego zakresu. będąc po raz kolejny dowodem ogromnej wiedzy i dojrzałości naukowej Doktorantki. Składa się z 12 podrozdziałów, w których systematycznie, krok po kroku, konfrontuje Ona swoje obserwacje z najbliższymi tematycznie doniesieniami literaturowymi. Moją uwagę przyciągnęły zwłaszcza obserwacje dotyczące potencjalnej korzystnej roli receptora p75 w przeciwdziałaniu demielinizacji. W ostatnim podrozdziale analizuje powody niemożności precyzyjnego określenia typu włókien mięśniowych (szybkie- wolne) w realizowanym projekcie. Wydaje mi się jednak, że ten krytycyzm jest nadmierny wobec ogromu pracy i wielkiej liczby danych otrzymanych w niniejszym projekcie. Na tym polega dobre działanie naukowe, że nie zamyka, lecz otwiera nowe szlaki badawcze. Rozprawę podsumowują 4 wnioski końcowe będące w większości odpowiedziami

na cele pracy i w sposób nie budzący wątpliwości wynikają z otrzymanych wyników. Wniosek drugi dotyczący podwyższenia ekspresji BDNF oraz TrkB w jądrach podłączowych NMJ zawiera stwierdzenie, „że może to wskazywać na zwiększoną aktywność troficzną mięśni i ich oddziaływanie ogólnoustrojowe” czego nie rozumiem, zwłaszcza działania ogólnoustrojowego. Bardzo proszę o wyjaśnienie co Autorka miała na myśli tak formułując ten wniosek. Praca napisana jest ze swadą, poprawną polszczyzną (choć ze skłonnością do obcych „wtrętów”) i bardzo starannie opracowana edytorsko.

Bibliografia liczy 177 pozycji, głównie z ostatnich lat.

Podsumowując pragnę podkreślić bardzo duże znaczenie poznawcze i potencjalnie przyszłościowo praktyczne ocenianej rozprawy wnoszącej cenny wkład w rozwój neurobiologii.

Przedstawione powyżej nieliczne uwagi krytyczne w niczym nie umniejszają mojej bardzo wysokiej oceny niniejszej rozprawy. Autorka wykazała się umiejętnością rozwiązywania złożonego i ciekawego problemu badawczego, precyzyjnego przeprowadzenia badań oraz dojrzałością do odpowiedniego opracowania uzyskanych wyników, czego dowodem jest recenzowana rozprawa.

Podsumowując stwierdzam, że przedstawione mi do oceny praca p.t. „mgr inż. Anny Głowackiej „ Stymulacja neuronalnej nadprodukcji BDNF w uszkodzonym rdzeniu kręgowym szczura; ocena zmian molekularnych i morfologicznych w okresie najlepszej poprawy funkcjonalnej” spełnia warunki określone w art.187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2023r. poz. 742 z późn. zm.). W związku z powyższym, wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Biologii Doświadczalnej im. Nenckiego w Warszawie z wnioskiem o dopuszczenie mgr inż. Anny Głowackiej do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora.

Pragnę również złożyć formalny wniosek o wyróżnienie rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Anny Głowackiej.



UNIWERSYTET JAGIELLOŃSKI
COLLEGIUM MEDICUM
W KRAKOWIE

Wydział Nauk o Zdrowiu

Prof. dr hab. Jerzy A. Żołądź

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr inż. Anny Głowackiej

Podstawa prawna:

Rada Naukowa Instytutu Biologii Doświadczalnej i Klinicznej im. Marcelego Nenckiego PAN w Warszawie w dniu 15 grudnia 2023 r., powołała prof. dr hab. Jerzego A. Żołądź z Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum w Krakowie na recenzenta rozprawy doktorskiej mgr inż. Anny Głowackiej pt. „Stymulacja neuronalnej nadprodukcji BDNF w uszkodzonym rdzeniu kręgowym szczura; ocena zmian molekularnych i morfologicznych w okresie najlepszej poprawy funkcjonalnej”.

Recenzję opracowano zgodnie z art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r.. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2023 r. poz. 742 z późn. zm.).

Ocena pracy

Przedłożona mi do recenzji rozprawa doktorska mgr inż. Anny Głowackiej pt.: „Stymulacja neuronalnej nadprodukcji BDNF w uszkodzonym rdzeniu kręgowym szczura; ocena zmian molekularnych i morfologicznych w okresie najlepszej poprawy funkcjonalnej” wykonana została w 2023 r. pod kierunkiem prof. dr hab. Małgorzaty Skup, w Grupie Neurobiologii Naprawczej Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN. Funkcję promotora pomocniczego

Katedra Fizjologii Wysiłku i Bioenergetyki Mięśni

ul. Skawińska 8, 31-066 Kraków, tel. +48 12 433 28 50, e-mail: sekretariat_kfwibm@cm-uj.krakow.pl

www.cm-uj.krakow.pl



UNIwersytet Jagielloński
Collegium Medicum
W Krakowie

Wydział Nauk o Zdrowiu

w tym przewodzie pełniła dr Olga Gajewska-Woźniak. Praca ta pod względem edytorskim została przygotowana bardzo starannie.

Tytuł pracy w brzmieniu „*Stymulacja neuronalnej nadprodukcji BDNF w uszkodzonym rdzeniu kręgowym szczura; ocena zmian molekularnych i morfologicznych w okresie najlepszej poprawy funkcjonalnej*” w zasadzie oddaje istotę pracy. Mając jednak na uwadze zakres uszkodzenia rdzenia kręgowego zastosowany w tym eksperymencie tj. całkowite przecięcie rdzenia kręgowego, można byłoby rozważyć pewną modyfikację tytułu wskazując w nim na ten fakt tj. „całkowite przerwanie ciągłości rdzenia kręgowego” zamiast jak w obecnym brzmieniu: „...w uszkodzonym rdzeniu kręgowym”.

Rozprawa doktorska mgr inż. Anny Głowackiej zawiera typowe dla prac doktorskich rozdziały i podrozdziały. Praca zawiera dobrze opracowane streszczenie zarówno w j. polskim jak i w j. angielskim. Pierwszy rozdział pracy – „Wprowadzenie” (str. 15-25) rozpoczyna się krótkim opisem kontroli lokomocji u zwierząt jak i generowania ruchu na poziomie rdzenia kręgowego. W dalszej jego części autorka wprowadza czytelnika w zagadania realizacji funkcji motorycznych przez aparat mięśniowy w tym w rodzaju włókien mięśniowych i typy jednostek motorycznych. Następnie przechodzi do uszkodzeń rdzenia kręgowego oraz jego skutków na poziomie rdzenia kręgowego jak i na poziomie synaps obwodowych i mięśni. Ta część pracy zawiera 2 starannie przygotowane ryciny ilustrujące omawiane mechanizmy.

Uwagi recenzenta:

Na stronach 15-17 omawiając „Realizację funkcji motorycznych przez aparat mięśniowy” autorka nie ustrzegła się pewnych błędów / nieścisłości. Charakteryzując różne typy włókien mięśniowych, używa tam zdefiniowanych wcześniej skrótów nazw jednostek motorycznych (FR, FF i S). Jest to nadużycie, gdyż typy włókien mięśniowych posiadają swoją odrębną



UNIWERSYTET JAGIELLOŃSKI
COLLEGIUM MEDICUM
W KRAKOWIE

Wydział Nauk o Zdrowiu

klasyfikację – nie stosowaną przez doktorantkę (zob, m.in. str. 17). Oprócz tego na stronie 16, charakteryzując metabolizm różnych typów włókien mięśniowych twierdzi, że: „*Metabolizm włókien S jest oksydacyjny, włókien FR oksydacyjno-glikolityczny, a włókien FF tylko glikolityczny*”. Ponadto na tej samej stronie doktorantka twierdzi, że: „*Włókna szybkie o dużej męczliwości (FF) charakteryzują się wyłącznie glikolitycznym metabolizmem, co oznacza, że wytwarzają energię bez udziału tlenu*”. Jest to wyrażenie nieprecyzyjne, gdyż nawet najszybsze włókna mięśniowe występujące u ludzi tj. włókna typu IIx zawierają mitochondria i wytwarzają ATP w procesie fosforylacji oksydacyjnej. Różnica zatem pomiędzy metabolizmem włókien typu I czy II nie dotyczy obecności lub braku danego szlaku metabolicznego w ich strukturach, lecz procentowego udziału różnych szlaków metabolicznych w wytwarzaniu ATP oraz maksymalnego tempa (mocy) wytwarzania ATP (mM ATP/s). Ponadto, prowadząc badania na szczurach doktorantka winna była wspomnieć, że u gryzoni występuje również miozyna typu IIb - nieobecna w mięśniach szkieletowych ludzi. Zatem u gryzoni występują 4 typy włókien mięśniowych tj.: włókna typu I, IIa, IIx i IIb oraz włókna hybrydowe. U ludzi natomiast tylko trzy: I, IIa, IIx. Odniosłem wrażenie, że ten zakres wiedzy doktorantka potraktowała zbyt pobieżnie.

Założenia i cele pracy przedstawione przez doktorantkę **na str. 27** są jasne i precyzyjne. Dotyczą one:

- (1) potwierdzenia terapeutycznego działania wektora (AAV) niosącego gen czynnika neurotroficznego pochodzenia mózgowego AAV-BDNF w zakresie poprawy lokomotorycznej po całkowitym przecięciu rdzenia kręgowego (SCT) u szczurów;
- (2) zbadania zakresu transgenizacji i zdolności sieci przetrwałych poniżej miejsca uszkodzenia do odpowiedzi na BDNF w czasie 2 tygodni po uszkodzeniu, z uwzględnieniem motoneuronów mięśni różnych funkcjonalnie: zginacze (TA) i prostownika (Sol) stawu skokowego;



UNIwersytet Jagielloński
Collegium Medicum
W Krakowie

Wydział Nauk o Zdrowiu

- (3) zbadania zmian w strukturze i ultrastrukturze złączy nerwo-mięśniowych TA i Sol;
- (4) próby wglądu w mechanizm działania rekombinowanego BDNF i dyskusja jego użyteczności w zastosowaniu klinicznym.

Materiał i metody. Ten rozdział pracy (str. 28-59) przedstawia opis procedur eksperymentalnych oraz przebieg eksperymentu na zwierzętach (50 dorosłych samców szczurów szczepu Wistar, o początkowej masie ciała 250-330 g).

Uwagi recenzenta:

Rozdział ten przygotowany jest poprawnie i przejrzysto. Zawarte w nim Tabele (n= 22) oraz Figury (n=4) ułatwiają percepcję tekstu. Nie jest dla mnie jasne używane przez doktorantkę w tej części pracy wyrażenie „bieżnik” (zob. np. str., 35, wiersz 5). Czy chodzi o wspomnianą na str. 61 (wiersz 9) ruchomą bieżnię mechaniczną (ang. *treadmill*), czy też o coś innego. Należałoby to wyjaśnić i ewentualnie ujednolicić używane nazewnictwo.

Wyniki.

Uzyskane wyniki przedstawiono na str. 60-86 zarówno w tabeli 1 jak i na rycinach (n=17). Zarówno tabele jak i ryciny przygotowane są bardzo starannie. Opis wyników jest jasny i przejrzysty.

Uwagi recenzenta:

W tym rozdziale zabrakło mi jednak danych dotyczących wpływu zastosowanej interwencji tj.: po podaniu dordzeniowo wektora AAV niosącego gen BDNF (AAV-BDNF) na poziom stężeń ATP, PCr i glikogenu w badanych mięśniach w końcowym okresie obserwowanej regeneracji



UNIWERSYTET JAGIELLOŃSKI
COLLEGIUM MEDICUM
W KRAKOWIE

Wydział Nauk o Zdrowiu

rdzenia. Ważnym z punktu widzenia dobrostanu mięśni w spoczynku jak i ich zdolności wysiłkowych byłoby zbadanie wpływu zastosowanej terapii na biogenezę mitochondriów w m. zginaczach jak i w m. prostownikach stawu skokowego w relacji do grupy kontrolnej. Do słabych punktów przedstawionych wyników należy również zaliczyć brak prezentacji BDNF na poziomie białek zarówno w rdzeniu kręgowym jak i w badanych mięśniach. Podobnie badania receptorów TrkB / p75 ograniczono do poziomów ekspresji transkryptów.

Dyskusja.

Dyskusja wyników własnych w świetle dokonań innych autorów (177 cytowanych prac, zob. str., 99-109) przeprowadzana przez Kandydatkę jest solidna i uwzględnia zarówno czysto poznawcze efekty przeprowadzonych badań jak i ich potencjalne zastosowania kliniczne. Warto zauważyć, że tę drugą kwestię tj. kliniczną aplikacyjność uzyskanych wyników doktorantka rozważa z należytą ostrożnością mając na uwadze niepełny ciągle obraz wpływu iniekcji AAV-BDNF do segmentu lędźwiowego L1-2 rdzenia kręgowego na regenerację przerwanego rdzenia kręgowego. Ważną kwestią adresowaną także przez doktorantkę w dyskusji jej rozprawy jest zjawisko wzrostu wrażliwości na ból w następstwie wywołanej nadekspresji BDNF w rdzeniu kręgowym. Istotnie, stanowić może ono duże wyzwanie w przypadku potencjalnego leczenia uszkodzeń rdzenia kręgowego z wykorzystaniem nadekspresji BDNF u ludzi.

W dyskusji zabrakło mi jednak kwestii omówienia wpływu przerwania ciągłości rdzenia kręgowego oraz prób jego leczenia poprzez wywołanie nadekspresji BDNF na status energetyczny mięśni szkieletowych w okresie zastosowanej terapii.

Inną kwestią wymagającą szerszej dyskusji jest stopień odzyskiwania funkcji lokomocyjnych zwierząt „leczonych” iniekcją AAV-BDNF do segmentu lędźwiowego L1-2 rdzenia kręgowego. Na stronie 61 autorka w opisie procedury badania funkcji lokomocyjnej zwierząt podaje, że była ona oceniana na bieżni ruchomej przy prędkości przesuwu taśmy wynoszącym 0,05



UNIwersytet Jagielloński
COLLEGIUM MEDICUM
W KRAKOWIE

Wydział Nauk o Zdrowiu

m/s. W badaniu tym zaobserwowano pewne pozytywne efekty terapii w tym wykonywanie ruchów „podobnych do kroczenia” (str. 61). Warto byłoby w dyskusji zaznaczyć, że prędkości przesuwu taśmy bieżni mechanicznej wynoszące 0.05 m/s zastosowane w tym eksperymencie były ok. 10 krotnie niższe od prędkości biegu uzyskiwanych przez zdrowe szczury badane na bieżni mechanicznej (zob. np. Hoydal i wsp. 2007).

Wnioski końcowe.

Głównym osiągnięciem naukowym doktorantki jest przedstawienie dodatkowych nowych dowodów o potencjale terapeutycznym BDNF w leczeniu uszkodzeń rdzenia kręgowego. Ważnym wnioskiem doktorantki jest stwierdzenie, że komórkami docelowymi dla rekombinowanego BDNF podawanego w tym eksperymencie (iniekcji AAV-BDNF) były zarówno neurony leżące w obrębie centralnego generatora lokomocji, jak też egzekwujące skurcz mięśni motoneurony odcinków lędźwiowych. Istotnym wynikiem uzyskanym w przeprowadzonym eksperymencie jest także potwierdzanie wcześniejszych doniesień innych badaczy, że nadekspresja BDNF prowadzi do obniżenia progu bólowego, co stanowić może istotne wyzwanie w przypadku planowania terapii uszkodzeń rdzenia kręgowego poprzez indukowanie nadekspresji BDNF.

Niezależnie od wskazanych w niniejszej recenzji uchybień, do których doktorantka będzie mogła się odnieść podczas publicznej obrony pracy, na podstawie ocenianej pracy doktorskiej mgr inż., Anny Głowackiej, stwierdzam, że Kandydatka posiada dużą wiedzę ogólną w dyscyplinie nauki biologiczne. Posiada także umiejętność samodzielnego prowadzenia badań z zastosowaniem zaawansowanych metod badawczych. Rozprawa doktorska mgr inż. Anny Głowackiej stanowi istotny wkład w poszerzenie naszej wiedzy o potencjale terapeutycznym BDNF w uszkodzeniach rdzenia kręgowego, co może w przyszłości mieć również znaczenie kliniczne.

Katedra Fizjologii Wysiłku i Bioenergetyki Mięśni

ul. Skawińska 8, 31-066 Kraków, tel. +48 12 433 28 50, e-mail: sekretariat_kfwibm@cm-uj.krakow.pl

www.cm-uj.krakow.pl



UNIwersytet Jagielloński
COLLEGIUM MEDICUM
W KRAKOWIE

Wydział Nauk o Zdrowiu

Rozprawę kończy wykaz 5 publikacji z udziałem doktorantki. Pracę doktorską mgr inż. Anny Głowackiej pod względem edytorskim oceniam bardzo wysoko.

Ocena końcowa:

Uważam, że oceniana rozprawa doktorska mgr inż. Anny Głowackiej spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2023 r poz. 742 z późn. zm) w związku z powyższym wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Biologii Doświadczalnej o dopuszczenie mgr inż. Anny Głowackiej **do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora.**

Prof. dr hab. Jerzy A. Żołędz

Kraków, 4 marca 2024 r.