



Instytut Farmakologii
im. Jerzego Maja
Polskiej Akademii Nauk

Kraków, 03-03-2025

Prof. dr hab. Agnieszka Nikiforuk
Zakład Badań Nowych Leków
Instytut Farmakologii im. Jerzego Maja PAN
ul. Smętna 12
31-343 Kraków

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Martyny Pękały zatytułowanej:

"Rola lipokaliny 2 w mysim modelu zaburzeń neurorozwojowych wywołanych aktywacją układu odpornościowego matki"

Praca doktorska Pani mgr Martyny Pękały, wykonana pod kierunkiem Promotora, Pani prof. dr hab. Katarzyny Kality-Bykowskiej, doskonale wpisuje się w aktualny nurt badań nad patogenezą zaburzeń neurorozwojowych. Doktorantka podjęła się określenia roli białka lipokaliny 2 w mechanizmach zaburzeń rozwoju mózgu w kontekście infekcji w okresie prenatalnym.

Jest to klasyczna rozprawa doświadczalna, obejmująca 168 stron, o przejrzystej strukturze zgodnej z obowiązującymi wymogami. Zasadniczą część poprzedza Spis treści, Streszczenie (w języku polskim i angielskim) oraz alfabetyczny wykaz stosowanych skrótów. Kluczowe rozdziały obejmują: Wstęp, Cele pracy, Materiały i metody, Wyniki, Dyskusję, Podsumowanie i wnioski oraz Bibliografię. Całość została starannie przygotowana zarówno pod względem merytorycznym, jak i edytorskim oraz językowym. Na szczególną uwagę zasługuje bogata dokumentacja graficzna obejmująca 25 rycin oraz obszerna bibliografia, licząca 432 pozycje literaturowe.

Wstęp zawiera przystępne i klarowne wprowadzenie do tematyki pracy, jednocześnie uzasadniając hipotezę badawczą oraz cele realizowane przez Autorkę. Zwraca ona uwagę, że jednym z czynników zaburzeń neurorozwojowych może być infekcja matki w czasie ciąży. Ma to potwierdzenie zarówno w danych epidemiologicznych, jak i rosnącej liczbie dowodów z badań na zwierzętach. Pomimo dużej użyteczności zwierzęcych modeli opartych na aktywacji układu odpornościowego matki (MIA), Autorka podkreśla znaczną zmienność obserwowanych efektów. Opisany zostaje wpływ MIA na zachowanie zwierząt oraz zmiany anatomiczne w mózgu, ze szczególnym uwzględnieniem deficytów synaptycznych, które mogą stanowić jeden z kluczowych patomechanizmów zaburzeń neurorozwojowych. Jednak dotychczasowe dane dotyczące wpływu MIA na strukturę i funkcję synaps

oraz podstawowe właściwości elektrofizjologiczne neuronów pozostają niejednoznaczne. Następnie Autorka analizuje mechanizmy leżące u podstaw zaburzeń rozwojowych wywołanych przez MIA, podkreślając, że prawidłowy rozwój mózgu zależy od wielu komponentów układu odpornościowego, których nieprawidłowa aktywacja podczas MIA może prowadzić do obserwowanych zmian rozwojowych.

Dalsza część Wstępu poświęcona jest lipokalinie 2 (Lcn2), białku związanemu z układem odpornościowym. Po omówieniu jego budowy, ligandów oraz receptorów, Autorka charakteryzuje funkcje Lcn2 w ośrodkowym układzie nerwowym, szczególnie w kontekście odpowiedzi immunologicznej. Zwraca również uwagę, że Lcn2 odgrywa istotną rolę w regulacji morfologii i aktywności neuronów oraz komórek glejowych, a także wpływa na zachowanie zwierząt. Mimo to, jego rola w patogenezie zaburzeń neurorozwojowych nie została dotąd gruntownie poznana, co stanowi podstawę do dalszych badań.

Autorka, opierając się na przesłankach przedstawionych we Wstępie, precyzyjnie określiła **Cele pracy**, którymi było zbadanie roli białka Lcn2 w procesach leżących u podstaw zaburzeń rozwoju mózgu myszy wywołanych aktywacją układu odpornościowego matki. W ramach tego zagadnienia sformułowano trzy szczegółowe cele badawcze: 1. Zbadanie ekspresji mRNA Lcn2 w mózgu na kolejnych etapach rozwoju pre- i postnatalnego. 2. Ocena wpływu wybranego modelu aktywacji układu odpornościowego matki na odpowiedź zapalną oraz ekspresję Lcn2 w mózgu płodów. 3. Analiza wpływu MIA i delecji genu Lcn2 na podstawowe właściwości elektrofizjologiczne neuronów, gęstość i morfologię kolców dendrytycznych oraz zachowanie zwierząt.

Metody badawcze zastosowane przez Autorkę w realizacji założonych celów zostały przedstawione w sposób klarowny i przemyślany. W rozdziale **Materiały i metody** Doktorantka opisuje zwierzęta doświadczalne oraz zastosowany model aktywacji układu odpornościowego matki. Następnie szczegółowo przedstawia procedury związane z przygotowaniem tkanki mózgowej do analizy ekspresji genów, izolacją RNA oraz reakcją RT-qPCR. Kolejne podrozdziały obejmują opisy pomiarów elektrofizjologicznych oraz analizę kształtu i gęstości kolców dendrytycznych. W następnym rozdziale przedstawione zostały badania behawioralne, w tym eksperymenty prowadzone w systemie Eco-HAB oraz trening apetytywny w klatce IntelliCage. Opis metod został wzbogacony poglądowymi ilustracjami:

Wyniki zostały przedstawione w sposób przejrzysty i usystematyzowany. Poszczególne etapy prowadzonych badań są uporządkowane, a dane zaprezentowano w sposób czytelny i spójny. Dodatkowo, przedstawione ilustracje schematów doświadczalnych znacząco ułatwiają zrozumienie zastosowanych metod i przebiegu eksperymentów.

Celem pierwszego etapu eksperymentów była charakterystyka ekspresji mRNA *Lcn2* w hipokampie myszy szczepu C57BL/6J na różnych etapach rozwoju pre- i postnatalnego. Autorka wykazała, że poziom mRNA *Lcn2* wzrastał aż do momentu narodzin, osiągając wartość maksymalną, po czym w okresie postnatalnym utrzymywał się na stałym poziomie aż do dorosłości. W kolejnym etapie oceniono wpływ wybranego schematu podań LPS na ekspresję mRNA *Lcn2* w mózgu w okresie prenatalnym. Badania wykazały, że zastosowany model MIA prowadzi do zwiększonej ekspresji mRNA *Lcn2* w korze mózgowej i hipokampie płodów myszy obu płci.

Wyniki te sugerowały, że białko *Lcn2* może być zaangażowane w regulację odpowiedzi zapalnej indukowanej przez MIA. Aby odpowiedzieć na pytanie, czy *Lcn2* odgrywa potencjalną rolę w zmianach neurorozwojowych wywoływanych przez MIA, wykorzystano model oparty na transgenicznym myszom z delecją genu *Lcn2*. W odpowiedzi na iniekcje LPS zaobserwowano wzrost ekspresji cytokin prozapalnych w przodomózgowiu i hipokampie płodów, przy czym efekt ten był nasilony u samców o genotypie niezmienionym. Co ciekawe, zwiększoną ekspresję mRNA *Lcn2* w odpowiedzi na MIA stwierdzono również w tych regionach mózgu u samców WT. Jak sugeruje Autorka, osłabiona indukcja mRNA cytokin prozapalnych u myszy *Lcn2* KO w porównaniu do WT może wskazywać na rolę *Lcn2* jako promotora odpowiedzi zapalnej.

Kolejne eksperymenty dotyczyły analizy właściwości elektrofizjologicznych oraz gęstości i morfologii kolców dendrytycznych neuronów pola CA1 hipokampa. Samce pozbawione genu *Lcn2* wykazywały podwyższoną pobudliwość własną komórek piramidowych w tym regionie, a efekt ten okazał się niezależny od prenatalnej ekspozycji na LPS. Procedura MIA skutkowała spadkiem gęstości kolców dendrytycznych neuronów hipokampa u samic WT, natomiast u samców wykazano, że brak białka *Lcn2*, niezależnie od podania LPS, prowadził do wzrostu gęstości kolców dendrytycznych.

Dalszy etap eksperymentów obejmował testy behawioralne. Analiza zachowania myszy w klatkach Eco-HAB wykazała, że zastosowany model infekcji prenatalnej prowadzi do zaburzeń interakcji społecznych zarówno u samców, jak i samic o niezmienionym genotypie. Co interesujące, podobne zaburzenia występowały również w wyniku samej delecji genu *Lcn2*. Wyniki testu trójkomorowego były mniej jednoznaczne. Prenatalna ekspozycja na LPS wywoływała zaburzenia socjalności wyłącznie u samic, a efekt ten był wyraźniejszy u zwierząt KO. Natomiast u samców spadek zainteresowania bodźcem społecznym obserwowano wyłącznie u zwierząt kontrolnych pozbawionych *Lcn2*.

Iniekcje LPS w okresie prenatalnym prowadziły do zwiększenia liczby zakopanych kulek wyłącznie u samców o genotypie dzikim. Co interesujące, podobnie jak w przypadku zaburzeń społecznych, sama delecja genu *Lcn2* u myszy kontrolnych również powodowała nasilenie powtarzalnych zachowań. Nie stwierdzono natomiast aby brak *Lcn2* wpływał na zachowania lękowe zwierząt. Analiza zachowania

myszy podczas treningu apetytywnego w klatce IntelliCage nie wykazała wpływu ani procedury MIA, ani delecji genu *Lcn2* na proces uczenia się motywowanego apetytywnie. Podsumowując uzyskane wyniki, Autorka konkluduje, że delecja *Lcn2* nie ma istotnego wpływu na zachowanie zwierząt narażonych na aktywację układu odpornościowego matki. Może to wynikać z faktu, że brak białka *Lcn2* podczas rozwoju prowadzi do deficytów podobnych do tych obserwowanych u potomstwa MIA o prawidłowym genotypie.

Sekcja **Dyskusji** w rozprawie doktorskiej została opracowana z dużą wnikliwością i rzetelnością naukową. Doktorantka w sposób płynny i spójny interpretuje uzyskane wyniki, a analiza przeprowadzonych eksperymentów w kontekście dostępnej literatury dowodzi umiejętności krytycznego myślenia oraz znajomości najnowszych doniesień naukowych. Ponadto Doktorantka klarownie przedstawia, w jaki sposób jej badania wpisują się w aktualny stan wiedzy. Całość Dyskusji cechuje logiczna argumentacja, która podkreśla wartość naukową rozprawy, a podsumowaniem całości są precyzyjnie sformułowane Wnioski.

Całokształt rozprawy doktorskiej oceniam bardzo wysoko. Mam jednak pewne uwagi i pytania, które mimo wszystko nie umniejszają wartości pracy.

Należałoby jednoznacznie podać całkowitą liczbę zwierząt oraz miotów wykorzystanych w badaniach.

Ogólna charakterystyka modelu LPS (przebieg ciąży, mioty) dotyczy wyłącznie myszy szczepu dzikiego. Brakuje danych dotyczących zwierząt transgenicznych, na których prowadzona była większość doświadczeń. Wskazane byłoby również podanie dodatkowych informacji, takich jak ogólna liczebność poszczególnych miotów, proporcje płci czy genotypu, a także parametry fizjologiczne potomstwa (np. masa ciała).

Możliwe, że różnice między miotami wpłynęły na uzyskane, czasem niejednoznaczne wyniki. Należy wyjaśnić, w jaki sposób ten czynnik został uwzględniony lub wyeliminowany. W opisie testów behawioralnych co prawda podano, że „*zwierzęta pochodzące z różnych miotów (od 5 do 8 miotów na grupę) zostały połączone w jednej klatce, zgodnie z płcią, genotypem i procedurą eksperymentalną, po 9-14 osobników w klatce*”. Opis ten wymaga doprecyzowania, szczególnie w kontekście różnej liczebności grup, a także sposobu wyodrębnienia zwierząt do innych testów, takich jak np. badania elektrofizjologiczne.

Z metodologii wynika, że te same zwierzęta były poddawane kolejnym testom behawioralnym. Czy ponowne testowanie mogło wpłynąć na uzyskane wyniki?

Konieczne jest wyjaśnienie, w jaki sposób ustalono liczebność grup w poszczególnych eksperymentach oraz czy była ona wystarczająca do uzyskania istotnych statystycznie wyników. Przykładowo, na ryc. 11 liczebność niektórych grup wynosi $N=3$, co budzi wątpliwości co do mocy statystycznej analizy.

Warto rozważyć zastosowanie dodatkowych testów oceniających funkcje poznawcze, np. pamięć roboczą, poza testem opartym na uczeniu się motywowanym apetytywnie. W teście

trójkomorowym, oprócz oceny socjalności, można było również wprowadzić drugą fazę oceniającą pamięć społeczną.

Przydatnym uzupełnieniem pracy mogło być zbiorcze zestawienie wyników (np. w formie tabeli), które umożliwiłoby przejrzyste porównanie charakteru i nasilenia obserwowanych zmian.

Podsumowując, oceniana rozprawa doktorska **prezentuje ogólną wiedzę teoretyczną** Kandydatki. We wstępnej części pracy Doktorantka rzetelnie i przemyślnie nakreśla kontekst teoretyczny swoich badań, tworząc solidne podstawy dla części eksperymentalnej. Autorka wykazuje się dogłębną znajomością literatury przedmiotu, a przedstawiony przegląd badań dowodzi jej doskonałej orientacji w tematyce. Analiza literatury zawarta w Dyskusji jest kompleksowa, spójna i logicznie uporządkowana, co świadczy o umiejętności syntetyzowania oraz krytycznej oceny dostępnej wiedzy. Rozprawa doktorska niewątpliwie **wykazuje umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej** przez Doktorantkę. Pani mgr Martyna Pękała jasno formułuje problem badawczy i realizuje go poprzez odpowiednio dobraną metodologię badawczą. Na szczególną uwagę zasługuje nie tylko jej szeroki warsztat metodologiczny, ale także umiejętna analiza i interpretacja wyników. Autorka, wykazując znajomość literatury przedmiotu, potrafi również krytycznie dyskutować uzyskane wyniki, wskazując ich znaczenie w kontekście dotychczasowych badań. Rozprawa doktorska **stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego**. Autorka, wykorzystując zaawansowane modele badawcze, podejmuje nowatorski temat o istotnym znaczeniu dla zrozumienia patogenezy zaburzeń neurorozwojowych. Choć uzyskane wyniki nie pozwalają jednoznacznie określić roli Lcn2 w mechanizmach wywołanych aktywacją układu odpornościowego matki, wnoszą istotny wkład w poszerzenie wiedzy na temat jego funkcji w rozwijającym się mózgu.

Uważam, że rozprawa doktorska Pani mgr Martyny Pękały zatytułowana „*Rola lipokaliny 2 w mysim modelu zaburzeń neurorozwojowych wywołanych aktywacją układu odpornościowego matki*” 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 późno zm.). W związku z powyższym, wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Biologii Doświadczalnej o dopuszczenie mgr Martyny Pękały **do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora**.


Agnieszka Nikiforuk

KATEDRA I ZAKŁAD TOKSYKOLOGII
WYDZIAŁ FARMACEUTYCZNY
UNIwersytet Medyczny w Lublinie

Kierownik: prof. dr hab. n. med. Jarosław Dudka

Siedziba: 20-950 Lublin, ul. Jaczewskiego 8b, tel. +48 81448 74 00

Lublin, dnia 14 marca 2025 r.

OCENA

rozprawy doktorskiej pt. „Rola lipokaliny 2 w mysim modelu zaburzeń neurorozwojowych wywołanych aktywacją układu odpornościowego matki” opracowanej przez **mgr Martynę Pękałę** ubiegającą się o stopień naukowy doktora, pod kierunkiem naukowym promotora **dr hab. Katarzyny Kality-Bykowskiej, prof. Instytutu Nenckiego PAN.**

Celem pracy były badania nad ustaleniem patomechanizmu zaburzeń neurorozwojowych zależnych od lipokaliny 2 (Lcn2) – białka związanego z wrodzoną odpowiedzią odpornościową.

Do najczęściej badanych zaburzeń neurorozwojowych należą: Autyzm, charakteryzujący się głównie problemami w zakresie komunikacji społecznej występujący u 1-2%; ADHD – zespół nadpobudliwości psychoruchowej z deficytem uwagi, które charakteryzuje się trudnościami w koncentracji, impulsywnością i nadpobudliwością, występujący u około 5-7% dzieci; Zaburzenia uczenia się, wynikające z zaburzeń przetwarzania informacji, w tym dysleksja, która występuje u 5-10% populacji dzieci oraz zaburzenia mowy i języka, które dotyczą około 5-8% populacji dzieci w wieku przedszkolnym. Już te dane wskazują, że zaburzenia neurorozwojowe są obecnie poważnym problemem. Niestety z roku na rok odnotowuje się tendencję wzrostową wszystkich zaburzeń neurorozwojowych. A zatem należy stwierdzić, że wybrany przez Doktorantkę temat badań odnosi się do bardzo aktualnego problemu, a fakt, iż jest on znaczącym problemem personalnym, rodzinnym i społecznym wskazuje, że jest tematem bardzo ważnym.

Przyczyny zaburzeń neurorozwojowych mogą być genetyczne oraz środowiskowe w okresie prenatalnym i okołoporodowym, w tym infekcje w czasie ciąży. Niestety, mechanizm wpływu infekcji w czasie ciąży na wzrost ryzyka zaburzeń neurorozwojowych pozostaje niewyjaśniony.

Aby to ustalić Autorka w oparciu o dotychczasowy stan wiedzy postawiła tezę, że istotną rolę w patomechanizmie zaburzeń neurorozwojowych zależnych od infekcji, a więc aktywacji układu odpornościowego, odgrywa lipokalina 2 (Lcn2).

Układ edytorski dysertacji jest typowy dla monograficznych prac doktorskich. Dla mnie nietypowe jest umieszczenie streszczenia pracy przed Wstępem, głównie dlatego, że w streszczeniu nie przywołuje się pozycji literaturowych. Wolałbym w tym miejscu krótkie wprowadzenie bez wyników i wniosków, zawierające tezę badawczą i jej uzasadnienie oparte na solidnym piśmiennictwie tematycznym.

Kiedy tytuł pracy zaczyna się od wyrazu „rola” zawsze zadaję sobie pytanie, czy jest to stwierdzenie, że dany czynnik odgrywa rolę, czy dopiero kwestia „roli” będzie oceniana. Najważniejsze jest jednak, że zaplanowany przez Doktorantkę układ eksperymentu pozwala na ocenę roli lipokaliny 2 – ponieważ bada wpływ delekcji genu. Często bowiem wnioskowanie co do roli ocenianego czynnika opiera się jedynie na korelacji, co jak wiadomo nie mówi nam o zależności przyczynowo-skutkowej.

Wstęp może się wydawać nieco za długi – liczy bowiem 38 stron. Jednak zadając sobie pytanie jakie fragmenty tekstu mogą być pominięte bez szkody dla omawianego zagadnienia, byłoby mi trudno takie wytypować. Kompozycja merytoryczna zagadnień opisanych we Wstępie jest bardzo dobrze dobrana – doskonale wprowadza czytelnika w zagadnienia będące przedmiotem badań. Autorka opisała etapy rozwoju mózgu u ludzi i myszy, zaburzenia neurorozwojowe u potomstwa, powstające w wyniku aktywacji układu odpornościowego matki. Następnie dokonała przeglądu zwierzęcych modeli aktywacji układu odpornościowego oraz zmian wynikających z aktywacji układu odpornościowego na różnych poziomach organizacji biologicznej komórki/tkanki oraz zmian behawioralnych. Bardzo ważnym rozdziałem był rozdział poświęcony prawdopodobnym mechanizmom leżących u podstaw zaburzeń rozwojowych wywołanych przez aktywację układu immunologicznego matki, ze szczególnym podkreśleniem roli lipokaliny 2. Z tego opisu wynika, że rola lipokaliny 2 wydaje się dość realna w omawianym mechanizmie, a więc jej wybór do badań własnych jest całkowicie uzasadniony. Doktorantka wykazała się szeroką znajomością zagadnień powiązanych tematycznie z postawioną tezą. Bardzo swobodnie porusza się w tej tematyce. Cała praca ma bardzo dobrze przemyślaną, logiczną strukturę. Tekst czyta się bardzo dobrze, stosunkowo trudne zagadnienia są przedstawione w jasny zrozumiały sposób, co świadczy o zdolności budowania właściwej narracji i dużej dojrzałości naukowej Doktorantki.

Cel badawczy, którym jest zbadanie udziału białka Lcn2 w procesach leżących u podstaw zaburzeń rozwoju mózgu myszy wywołanych aktywacją układu odpornościowego matki, należy uznać za



innowacyjny. Mimo, że funkcje białka Lcn2 w dorosłym mózgu były przedmiotem wielu badań, jego rola w rozwijającym się prawidłowo układzie nerwowym oraz patomechanizmie zaburzeń neurorozwojowych jest bardzo słabo poznana. Cel badań został zdefiniowany precyzyjnie i pozostaje w zgodzie z tytułem pracy i postawioną wcześniej tezą badawczą. Dodatkowo Doktorantka sformułowała bardzo poprawnie szczegółowe cele i konsekwentnie realizowała je w przebiegu eksperymentu.

Badania przeprowadzono na modelu mysim za zgodą I Lokalnej Komisji Etycznej ds. Doświadczeń na Zwierzętach w Warszawie. W pierwszym etapie oznaczono poziom ekspresji mRNA Lcn2 w mózgu na kolejnych etapach rozwoju pre- i postnatalnego myszy szczepu dzikiego obu płci. W drugim etapie przeprowadzono badania pozwalające na ocenę wpływu aktywacji układu odpornościowego matki (MIA), za pomocą iniekcji LPS, na odpowiedź zapalną oraz ekspresję Lcn2 w mózgu płodów. I wreszcie przebadano wpływ MIA i delecji genu Lcn2 na powstawanie zaburzeń neurorozwojowych.

Bardzo dużą wartością tej pracy jest zastosowanie różnych technik badawczych do oceny zaburzeń na różnych poziomach organizacji biologicznej, tj. na poziomie molekularnym, i strukturalnym. Poczynając od badania, zarówno u myszy dzikich jak i u myszy z delecją Lcn2, ekspresji genów dla lipokaliny 2 i dla markerów zapalnych w łożysku, hipokampie i przodomózgowiu płodów i dorosłego potomstwa, badania elektrofizjologiczne na skrawkach tkanek pobranych z mózgu, czy badania kolców dendrytycznych – kształt i gęstość (mikroskopia konfokalna). Również bardzo wartościowe było przeprowadzenie szerokiego panelu badań w kierunku zaburzeń funkcji: badania behawioralne u dorosłego potomstwa - badania zachowań społecznych, w tym towarzyskość, preferencję zapachu społecznego i ogólną aktywność, badania zachowań powtarzalnych i kompulsywnych, badania zaburzeń lękowych, a także z bodźcem pozytywnym – test apetytywny. Ponadto przeprowadzono badania przyrostu masy ciała matek otrzymujących LPS i przeżywalność płodów, dzięki czemu wiemy, że prawie 50% cięż samiec otrzymujących LPS kończyło się martwym urodzeniem, w przeciwieństwie do kontroli, w której nie obserwowano martwych urodzeń. Tutaj warto było podać krótką charakterystykę stanu klinicznego i dobrostanu zwierząt w okresie rozwoju postnatalnego, ponieważ tak duża śmiertelność nasuwa podejrzenia, że stan zdrowia pozostałych zwierząt mógł nie być zadawalający. Rzeczywiście, Autorka badała przyrost masy ciała u ciężarnych samic z MIA, ale warto odnieść się do ogólnego stanu klinicznego ciężarnych matek i potomstwa. Sam przyrost masy ciała jest ważnym parametrem ponieważ może on świadczyć od toksyczności ogólnoustrojowej. Na ryc.8B, przedstawiono na początku pomiaru spadek przyrostu masy ciała dla ciężarnych samic, a potem przyrost masy ciała już się nie różni w porównaniu do kontroli, ale jak wynika z ryciny



bezwzględna masa ciała w grupie badanej pozostaje nadal niższa niż w kontroli, a zatem samice nie wyrównały masy ciała ze zwierzętami grupy kontrolnej.

Opis metodyki jest wystarczający do odtworzenia badań w innych laboratoriach. Świadczy on o dużej znajomości technik badawczych i umiejętności syntetycznego opisu planowanych badań.

Na kilka kwestii czytelnik nie znajduje odpowiedzi po przeczytaniu rozdziału Materiały i metody. Na przykład ile zwierząt użyto do wszystkich badań; Czy te same zwierzęta przechodziły różne testy – jeśli tak to w jakiej chronologii; Na ilu osobnikach wykonywano oznaczenia poszczególnych testów z danej grupy. Jeśli nie wszystkie osobniki były przebadane w danym teście, a tylko niektóre, to jakim kluczem kierowano się przy wyborze osobników z danej grupy?

Wyniki badań przedstawiono na 18 rycinach, w tym 73 wykresach, zaplanowanych graficznie tak, aby w jasny sposób przedstawić zależności między badanymi grupami. Doktorantka, w sposób syntetyczny, w pełni wystarczający, opisała najważniejsze spostrzeżenia w kontekście stawianych celów badawczych. Opis wyników jest jasny i zrozumiały. Dodatkowym atutem rycin są umieszczone schematy procedury badawczej, lub odczyty z aparatury, co znacznie ułatwia zrozumienie. Opis wyników wymagał umiejętności analitycznych, przez co Doktorantka wykazała dużą dojrzałość naukową.

Dyskusja podzielona jest na podrozdziały, co nadaje większej przejrzystości omawianym zagadnieniom. Skupia się na wynikach badań ściśle powiązanych z postawionym celem badawczym. Każdy rodzaj badania jest poparty uzasadnieniem na tle aktualnego piśmiennictwa, a wyniki badań są interpretowane przez Doktorantkę i dyskutowane w konfrontacji z badaniami innych zespołów. Przywoływanie piśmiennictwa jest dobrze uzasadnione i wyważone. Doktorantka uniknęła często występującego błędu polegającego na zbyt dużym wprowadzaniu kolejnych informacji, po których Dyskusja w znacznej mierze stanowi rodzaj pracy przeglądowej.

Doktorantka swobodnie prowadzi dyskusję co świadczy o jej dużej wiedzy ogólnej. Oceniając treść merytoryczną rozdziału stwierdzam, że mgr Martyna Pękała wykazała się bardzo dobrą orientacją w piśmiennictwie naukowym dotyczącym problematyki badań. Zaznaczyć należy, że przeprowadzenie rozważnej i merytorycznej dyskusji świadczy o dużej wiedzy i dojrzałości naukowej Doktorantki.

Różprawę kończy rozdział pt. „Podsumowanie i wnioski”. Wniosek czwarty jest w głównej mierze zbiorem wyników badań. Pozostałe wnioski są dobrze wyważone i zinterpretowane w kontekście uzyskanych wyników. Wszystkie wnioski są spójne z tytułem rozprawy i odpowiadają na postawiony cel badawczy. Rozdział ten świadczy o zdolności Doktorantki do syntetycznej analizy.



Bibliografia jest bardzo bogata – zawiera 432 pozycje. Wydaje się, że przy wyborze można było ograniczyć ich liczbę, kierując się przesłankami nowości oraz znaczeniem grup badawczych w rozwoju danego zagadnienia merytorycznego. Przywoływane artykuły są aktualne, zdecydowana większość pochodzi z ostatnich 15 lat.

Drobne uwagi edytorskie:

- W podrozdziale 1.5.3 poświęconym zmianom anatomicznym w mózgu obserwowanym w zwierzęcych modelach MIA, na str. 26 w przedostatnim akapicie pojawiają się zagadnienia związane z deficytami w układach neuroprzekaźników, a więc niepowiązane tematycznie z tym podrozdziałem.
- na rycinie 7, nie przedstawiono danych dla obu płci, mimo, że w tekście (str., 69) Autorka podaje, że badania przeprowadzono na hipokampie myszy obu płci.
- W całej pracy wielokrotnie pojawia się kolokwialna fraza „tkanka mózgowa” co nie znajduje odzwierciedlenia w nomenklaturze histologicznej.
- Nieco obco brzmi wyraz „neuroinflamacja” na str. 46, akapit 2 wiersz 7.

Podsumowanie

Zgodnie z uzasadnieniem opisanym powyżej, w mojej ocenie Doktorantka w całej rozprawie doktorskiej zaprezentowała ogólną wiedzę teoretyczną przewyższającą wymagania na stopień doktora.

Dobór i opis przeprowadzonych badań ich duża różnorodność począwszy od badań genetycznych, molekularnych, mikroskopowych (mikroskopia konfokalna), elektrofizjologicznych i wreszcie liczne badania behawioralne, a także dojrzałe przeprowadzenie dyskusji i analityczne wnioskowanie świadczą o możliwości samodzielnego prowadzenia pracy naukowej i koordynowania prac zespołu badawczego.

Przeprowadzone badania mają charakter badań podstawowych ale o dużym prawdopodobieństwie ich wykorzystania w przyszłości w celach aplikacyjnych, np. w poszukiwaniu leków w chorobach neurodegeneracyjnych. Doktorantka w swojej pracy rozwiązała kilka problemów badawczych. Ogólnie, uzyskane wyniki nie pozwoliły na jednoznaczne określenie roli lipokaliny 2 w rozwoju zaburzeń wywołanych aktywacją układu odpornościowego matki, ale wskazują, że białko to pełni istotne funkcje podczas prawidłowego rozwoju mózgu.



Mając powyższe na uwadze stwierdzam, że rozprawa doktorska **Pani mgr Marty Pękały** pt. „Rola lipokaliny 2 w mysim modelu zaburzeń neurorozwojowych wywołanych aktywacją układu odpornościowego matki” spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018r. 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 Martyny Pękały** do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora.

Równocześnie, zgłaszam wniosek o wyróżnienie rozprawy doktorskiej ze względu na duży zakres i różnorodność przeprowadzonych badań, wysoki poziom dyskusji i staranność w redagowaniu całej pracy zarówno pod względem merytorycznym jak i edytorskim.



Prof. dr hab. n. med. Jarosław Dudka

Marta B Wiśniewska
Laboratorium Neurobiologii Molekularnej
Centrum Nowych Technologii UW
ul. Banacha 2C
02-097 Warszawa
E.mail: m.wisniewska@cent.uw.edu.pl

Warszawa, 16/04/2025

*Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Martyny Pękały pt.
"Rola lipokaliny 2 w mysim modelu zaburzeń neurorozwojowych wywołanych
aktywacją układu odpornościowego matki"
wykonanej
w Instytucie Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego
Polskiej Akademii Nauk
pod kierunkiem dr. hab. Katarzyny Kality-Bykowskiej, prof. Instytutu Nenckiego PAN*

Dane epidemiologiczne wskazują, że infekcje przebiegające u matki w okresie ciąży są istotnym czynnikiem ryzyka wystąpienia zaburzeń neurorozwojowych (NDD) u dziecka, takich jak spektrum autyzmu (ASD) czy zespół nadpobudliwości psychoruchowej z deficytem uwagi (ADHD). Przedstawiona do recenzji rozprawa opisuje badania hipotetycznego udziału lipokaliny 2 – białka nieswoistej odpowiedzi odpornościowej – w genezie NDD w następstwie infekcji matczynych. Eksperymenty zostały przeprowadzone na modelach mysich.

Doktorantka podjęła się ważnego problemu badawczego - słabo poznanego mechanizmu udziału infekcji matczynych w etiologii NDD. Formułując cel pracy, kierowała się trzema głównymi przesłankami. Po pierwsze, aktywacja matczynej odpowiedzi odpornościowej (MIA) zwiększa ryzyko wystąpienia NDD, czemu towarzyszą zmiany w morfologii neuronów. Po drugie, poziom lipokaliny 2 wzrasta w mózgu w stanach zapalnych. Po trzecie, zwierzęta z nokautem genu lipokaliny 2 (*Lcn2*) wykazują nieprawidłowości w obrębie drzewka dendrytycznego i kolców dendrytycznych oraz zaburzenia behawioralne przypominające te obserwowane w następstwie MIA.

Hipoteza, że w efektach MIA w układzie nerwowym pośredniczy lipokaliny miała więc logiczne podstawy.

Zastosowano dwa mysie modele eksperymentalne. Pierwszym była aktywacja nieswoistej odpowiedzi immunologicznej poprzez dootrzewnową iniekcję lipopolisacharydów u ciężarnych samic. Wykorzystanie lipopolisacharydów jako czynnika aktywacji MIA było uzasadnione, a zalety tego modelu zostały krótko omówione przez Doktorantkę w rozdziale *Wstęp*. Niestety, metoda wiązała się z bardzo wysoką, około 50%, śmiertelnością płodów. Pojawia się więc wątpliwość, czy zastosowana dawka nie była zbyt duża, co mogło prowadzić do efektów niespecyficznych. W części *Dyskusja* Doktorantka wyjaśnia, że dawka została dobrana tak, aby zapewnić powtarzalny wzrost lipokaliny 2 przy akceptowalnym odsetku poronień. Rozumiem więc, że przy mniejszych dawkach efekt był niepowtarzalny. Nie ma modeli idealnych, jednak zastanawiam się, *czy rozpoczynając projekt ponownie Doktorantka rozważałaby alternatywne podejście (jakie), czy jednak zdecydowanie broniła wybranej strategii.*

Drugim wykorzystanym modelem był nokaut genu *Lcn2*. Aby zapewnić identyczne warunki rozwoju dla myszy różnych genotypów, zastosowano przemyślany schemat eksperymentalny: krzyżowano myszy heterozygotyczne, otrzymując w jednym miocie zarówno potomstwo o genotypie dzikim, jak i pełnym nokautem *Lcn2*, rozwijające się w tym samym środowisku prenatalnym. Oczekiwałabym tutaj wyjaśnienia *czy myszy heterozygotyczne wykazują różnice fenotypowe w stosunku do myszy o genotypie dzikim.*

Do tego dobrze skonstruowanego schematu badań włączono również analizę samców i samic. Takie podejście staje się standardem, ale nie jest jeszcze normą. To jest prawdopodobnie pierwszy recenzowany przez mnie doktorat, w którym je zastosowano. Decyzja okazała się trafna, ponieważ wyniki ujawniły znaczne różnice między płciami. Na przykład, choć MIA indukowała pojawienie się cytokin prozapalnych w łożysku u płodów obu płci, wzrost ich poziomu w mózgu oraz wzrost lipokaliny 2 w mózgu stwierdzono jedynie u samców.

Dużo mówi się o wieloczynnikowej etiologii ASD i ADHD, jednak stosunkowo niewiele badań uwzględnia tę złożoność. Projekt doktorski, w którym uwzględniono zarówno infekcję matczyną, jak i deficyt lipokaliny 2, stanowi przykład takiego podejścia, co jest z pewnością jego mocną stroną, mimo że pierwotna hipoteza nie została na tym etapie potwierdzona. *Zastanawiam się, czy wpływ nokautu Lcn2 na efekty MIA nie mógł być maskowany przez kompensacyjną aktywność białek o podobnej funkcji.* Wyniki uzyskane przez Doktorantkę znacznie poszerzają wiedzę o wpływie czynników pro/przeciw-zapalnych na morfologię neuronów. Jej badania potwierdziły i rozszerzyły katalog wcześniej opisanych efektów MIA oraz deficytu lipokaliny 2 na pobudliwość i morfologię neuronów oraz behavior. Co ważne, wykazały, jak silnie te efekty zależą od płci, o czym wcześniej nie było wiadomo. Ponadto Doktorantka wykazała obecność

lipokaliny 2 w mózgu myszy w czasie rozwoju, co - w połączeniu z wynikami analiz morfologicznych - wskazuje na jej udział w regulacji dojrzewania neuronów.

Tekst rozprawy bez trudu prowadzi czytelnika przez złożoność projektu i przedstawionych wyników – wrażenie to towarzyszy lekturze od pierwszych stron. Doceniam klarowne i rzeczowe *Streszczenie*, stosunkowo krótkie, a jednak dające obraz problemu badawczego i całości pracy, co ułatwia dalszą lekturę. Obszerny *Wstęp* przedstawia zarówno szerokie tło badań, jak i szczegółowe informacje bezpośrednio związane z tematem rozprawy. Jego przemyślana struktura i trafnie dobrane treści wyznaczają perspektywę, która łączy konkretne pytania badawcze z ich szerszym kontekstem biologicznym i odniesieniem do zaburzeń neurorozwojowych u ludzi. Dużą wartość ma zestawienie czasowego przebiegu rozwoju mózgu u myszy i człowieka, uwzględniające przesunięcie istotnych etapów z okresu postnatalnego u gryzoni na prenatalny u ludzi. Doktorantka wykazała się w tym miejscu zrozumieniem, jak nieoczywiste jest przekładanie wyników badań na modelach zwierzęcych na mechanizmy leżące u podstaw NDD u człowieka.

Przy realizacji projektu Doktorantka wykazała się zróżnicowanym warsztatem badawczym, obejmującym metody badania ekspresji genów, rejestracje elektrofizjologicznych w skrawkach mózgu oraz testy behawioralne. Techniki badawcze są wyczerpująco opisane w rozdziale *Materiały i Metody*, a opisy eksperymentów w rozdziale *Wyniki* świadczą o dużej świadomości badawczej Doktorantki. Przejrzyste przedstawienie bardzo złożonych wyników na rycinach z pewnością wymagało dogłębnego przemyślenia, a trafny dobór metod statystycznych dodatkowo potwierdza wysoką jakość i rzetelność przeprowadzonych badań.

Doktorantka zebrała imponujący zbiór bardzo złożonych wyników, których interpretacja stanowi wyzwanie. Byłam ciekawa, jak poradzi sobie z tym problemem w rozdziale *Dyskusja*. Doktorantka "zjadała słońca po kawałku". *Dyskusja* jest bardzo prosto zorganizowana. W pierwszym rozdziale Doktorantka krytycznie omawia zastosowany model MIA, a w kolejnych etapowo interpretuje wyniki, umiejętnie osadzając je na tle dotychczasowych ustaleń. Nie zagłębia się w nadmierne szczegóły, lecz koncentruje na najważniejszych zmianach, co świadczy o jej umiejętnościach analizy i syntezy. Doktorantka wskazuje również na ograniczenia techniczne stosowanych metod, na przykład przy analizie kolców dendrytycznych na obrazach dwuwymiarowych. Doceniam także zwięzłą refleksję dotyczącą metody analizy behawioralnej, ukazującą, że Doktorantka zdaje sobie sprawę z niepewności w interpretacji danych behawioralnych. Przykładowo, poruszyła kwestię czy test zakopywania kulek należy interpretować jako przejaw aktywności stereotypowej, czy raczej jako wyraz lęku. W dwóch końcowych rozdziałach rozważa kwestie ogólniejsze - potencjalne przyczyny deficytów u myszy z nokautem *Lcn2* oraz wpływ czynników płciowych na efekty MIA i deficytu lipokaliny 2. Choć rozdziały te mają charakter spekulacyjny, utrzymane są w rygorze ostrożności. Postawiono w nich interesujące hipotezy, otwierające kierunki dalszych badań. Szczególnie ciekawa jest koncepcja, że różnice między płciami w

wynikach uzyskanych w projekcie doktorskim, a co równie istotne – w częstości występowania NDD u chłopców, mogą wynikać z odmiennych reakcji układu odpornościowego regulowanych przez hormony płciowe.

Podsumowując, rozprawę doktorską Pani Martyny Pękały oceniam bardzo wysoko. Jestem przekonana o szerokiej wiedzy Doktorantki i umiejętności samodzielnego i krytycznego myślenia. Przeprowadzona oryginalna praca badawcza poszerza wiedzę na temat zależności między infekcjami matczynymi a wystąpieniem choroby neurorozwojowej u potomstwa, wkraczając na obszary dopiero odkrywane: po latach koncentrowania się na neuronach, coraz większą uwagę przyciąga udział pozaneuronalnych czynników w etiologii tych zaburzeń.

Stwierdzam, że przedstawiona do recenzji rozprawa spełnia ustawowe warunki stawiane pracom doktorskim (określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce – Dz.U. 2023, poz. 742) i stawiam wniosek o dopuszczenie mgr Martyny Pękały do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora. Wnioskuje również o wyróżnienie rozprawy.