UNIWERSYTET MEDYCZNY W ŁODZI

Łódź, dn. 10.03.2025 r.

Dr hab. n. med. Tomasz Boczek
Zakład Neurochemii Molekularnej
Uniwersytet Medyczny w Łodzi
ul. Mazowiecka 6/8, 92-215 Łódź

Recenzja
rozprawy doktorskiej mgr inż. Patrycji Kruk
pt. „The role of astrocytic CD44 protein in epileptogenesis"

Podstawą do wykonania przedmiotowej recenzji jest uchwała Rady Naukowej Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN w Warszawie oraz pismo Dyrektor Instytutu prof. dr hab. Agnieszki Dobrzyń, datowane na dzień 29 stycznia 2025 r.

Praca doktorska została wykonana pod kierunkiem dr hab. Joanny Dzwonek, profesor Instytutu Nenckiego PAN w toku realizacji projektu badawczego nr 2015/17/B/NZ4/02540 pozyskanego z Narodowego Centrum Nauki w ramach konkursu OPUS.

Epilepsja należy do grupy przewlekłych schorzeń neurologicznych, które charakteryzuje występowanie niekontrolowanych napadów drgawkowych o różnym nasileniu i czasie trwania, mających swoje źródło w przejściowych zaburzeniach czynności bioelektrycznej mózgu. Padaczka jest chorobą o zróżnicowanej etiologii, a jej występowanie może wiązać się z czynnikami genetycznymi, strukturalnymi, zaburzeniami metabolicznymi lub pozostawać nieokreślone. Szacunkowe dane epidemiologiczne WHO wskazują, że choroba ta dotyka ok. 1% światowej populacji, przy czym większość przypadków notuje się w krajach rozwijających się. Niepojącym faktem jest, że u ok. 30% pacjentów rozwija się padaczka lekooporna (opracowanie *The Lancet Neurology*, 2023), co stanowi poważne wyzwanie dla współczesnej medycyny i wymusza poszukiwanie nowych terapeutyków oraz opracowanie skutecznych schematów postępowania leczniczego.

Liczne doniesienia naukowe wskazują, że astrocyty odgrywają kluczową rolę w patogenezie padaczki ze względu na ich istotną rolę w regulacji pobudliwości neuronalnej oraz wpływ na równowagę neurochemiczną mózgu. Wiele z tych badań sugeruje, że dysfunkcja astrocytów przyczynia się m.in. do zaburzeń metabolizmu glutaminianu, homeostazy jonowej, procesów neurozapalnych oraz zmian strukturalnych w tkance nerwowej, co znacząco zwiększa podatność na napady padaczkowe i przyspiesza postęp choroby. Z medycznego punktu widzenia istotne jest poznanie przyczyn nieprawidłowego funkcjonowania astrocytów w epilepsji, w szczególności

dysfunkcyjnych szlaków gliotransmisji, co może stanowić podstawę dla opracowania obiecujących terapii przeciwpadaczkowych.

W swojej pracy doktorskiej mgr inż. Patrycja Kruk podjęła się ambitnego zadania wyjaśnienia roli astrocytarnej glikoproteiny Cd44 w powstawaniu napadów padaczkowych, przebudowie hipokampa oraz zmianach w strukturze synaps w zwierzęcym modelu drgawek indukowanych kwasem kainowym. Iniekcje tego kwasu bezpośrednio do hipokampa pozwalają na odwzorowanie wielu kluczowych zmian patologicznych i behawioralnych charakterystycznych dla ludzkiej padaczki skroniowej.

Rozprawa ma formę klasycznej dysertacji podzielonej na dziesięć głównych rozdziałów, z których ostatni poświęcono na przedstawienie dorobku publikacyjnego autorki. Wprowadzenie do omawianego zagadnienia oraz zasadność podjętej problematyki zostały zawarte w rozdziale wstępnym, który rozpoczyna się od krótkiego opisu padaczki, a następnie przedstawia szczególną rolę hipokampa w generowaniu napadów padaczkowych, a także udziału astrocytów i białka Cd44 w epilepsji. Rozdział kończy się omówieniem systemu Cre-loxP, za pomocą którego podjęto próbę uzyskania transgenicznej myszy z nokautem genu *Cd44*. Tekst wyróżnia się starannością w doborze literatury oraz dobrze wyważonymi proporcjami pomiędzy objętością poszczególnych podrozdziałów. Całość uzupełniają czytelne ryciny, które znacząco ułatwiają zrozumienie złożoności podjętej tematyki oraz zastosowanych nowoczesnych technik eksperymentalnych. Szczególną uwagę poświęcono systemom rekombinacji umożliwiającym warunkowy nokaut genu oraz wykorzystaniu wirusów AAV, które zyskują coraz większe znaczenie jako niepatogenne nośniki wektorów terapii genowej. Możliwości oferowane przez te wirusy, zwłaszcza ich zdolność do wprowadzania modyfikacji w obrębie danej struktury bądź tkanki, np. zastosowanie AAV2 do ekspresji transgenu w neuronach drogi wzrokowej, postrzegałbym jako ich ogromną zaletę, choć zdaję sobie sprawę, że ich wykorzystanie może być w wielu przypadkach ograniczone (str. 35, „*one of the main disadvantages may be the fact that the recombination is limited only to targeted cells in the area where the vector was injected*").

Z rozważań teoretycznych płynnie wyłania się kolejny rozdział, w którym zostały przedstawione poprawnie sformułowane cele pracy. Rozdział poświęcony materiałom i metodom został napisany w sposób przejrzysty, z zachowaniem odpowiedniego poziomu szczegółowości w opisie stosowanych procedur doświadczalnych. **W odniesieniu do iniekcji AAV5 (str. 44) - jaka objętość roztworu o mianie wirusa podanym w tabeli nr 3.4 została wstrzyknięta do zakrętu zębatego hipokampa?**

Część doświadczalna pracy jest niezwykle interesująca, z wyważonym opisem uzyskanych wyników oraz starannie wykonanymi rycinami. Rzetelność doktorantki zasługuje w mojej ocenie na szczególne podkreślenie. W przeciwieństwie do przeważającej większości prac naukowych, które prezentują zazwyczaj wyniki eksperymentów zakończonych sukcesem, w swojej dysertacji mgr inż. Kruk dokumentuje próby uzyskania myszy z delecją *Cd44* w astrocytach, wykorzystując

system oparty na indukowanej tamoksyfenem ekspresji rekombinazy Cre. Pomimo zastosowanych modyfikacji w zakresie m.in. ilości dawek tamoksyfenu czy czasu potrzebnego na aktywację systemu Cre-loxP, nie zaobserwowano zmian w poziomie białka Cd44 w zakręcie zębatym hipokampa, co wskazuje na nieskuteczność zastosowanego systemu rekombinacji, o czym wspomina także autorka (str. 60 „*the conditional TAM-inducible Cre-loxP system is not reliable for generating a total astrocyte-specific CD44 knockout mouse*"). Chciałbym nadmienić, że proces uzyskiwania zwierząt transgenicznych (w tym przypadku podwójnie transgenicznych) jest żmudny, wymagający wielokrotnego krzyżowania osobników oraz systematycznego genotypowania potomstwa. Domniemam, że ten etap prac eksperymentalnych był dla doktorantki szczególnie pracochłonny i czasochłonny. Tym bardziej cenne dla innych badawczy są wnioski płynące z przeprowadzonego eksperymentu.

Pomimo przeprowadzonej dyskusji dotyczącej możliwych powodów braku zmian w poziomie białka CD44 u myszy GFAP-Cre^{ERT2}xCD44$^{fl/fl}$ chciałbym w tym miejscu zapytać czy:

1. **zbadano skuteczność systemu Cre-loxP w uzyskanych zwierzętach podwójnie transgenicznych? Nie wiadomo nic o wyjściowej aktywności rekombinazy Cre w linii użytej do krzyżowania, a w przypadku jej potwierdzenia, czy cecha ta utrzymała się także w krzyżówce podwójnie transgenicznej?**
2. **wykonano próbę kontrolną indukcji ekspresji rekombinazy Cre w odpowiedzi na tamoksyfen?**
3. **doktorantka rozważała zastosowanie systemu Cre-loxP, w którym ekspresja rekombinazy Cre nie jest zależna od tamoksyfenu? Zastosowanie tego systemu pozwoliło np. na uzyskanie stabilnej delecji genu *Cd44* w keratynocytach [odnośnik literaturowy nr 175].**

W tej sytuacji alternatywnym (i zasadnym) rozwiązaniem było wykorzystanie AAV5, za pomocą których dostarczano rekombinazę gfaABC1D:eGFP-Cre bezpośrednio do zakrętu zębatego myszy CD44$^{fl/fl}$, co pozwoliło na obniżenie poziomu białka Cd44 o ok. 60-70%. Tak uzyskane zwierzęta wykorzystano w dalszych badaniach. Chciałbym zwrócić uwagę, że zastosowanie takiego podejścia pozwoliło na uzyskanie zwierząt typu *knock-down* (na co wskazują wyniki na rycinie 4.5), a *nie knock-out.* Doktorantka kilkukrotnie używa sformułowań, które zarówno w języku polskim, jak i angielskim, sugerują, że uzyskano delecję genu *Cd44* np. (str. 65) „*Those results show that the AAV5-mediated expression (...) leads to the deletion of CD44 in the hippocampal astrocytes*"; (ta sama strona) "*The CD44$^{fl/fl}$ mouse line (...) provided sufficient deletion of astrocytic CD44 in the hippocampal formation*". Użycie zwotów typu *knock-out* czy *deletion* w odniesieniu do uzyskanego modelu zwierzęcego z obniżeniem ekspresji *Cd44* powtarza się kilkukrotnie w pozostałych rozdziałach dysertacji.

Wykorzystanie AAV do wprowadzenia transgenu wyłącznie do określonego typu komórek (w tym przypadku astrocytów) wiąże się z pewnymi kontrowersjami, zwłaszcza w kontekście

ograniczonej swoistości tych wirusów oraz możliwości ekspresji w innych typach komórek, w tym w neuronach oraz – w niewielkim stopniu – w komórkach śródbłonka. W kontekście tropizmu wirusów AAV oraz stwierdzeń autorki zawartych w dyskusji na str. 89 (np. „*following later KA treatment, GFP expression was also detected in the DG granule neurons, suggesting that AAV5 may also infect these cells*" nasuwają się następujące pytania:

1. **Dlaczego Doktorantka zdecydowała się na wybór akurat serotypu 5 AAV?**
2. **Czy możliwe jest oszacowanie jaki odsetek neuronów hipokampa wykazuje ekspresję GFP a zatem i rekombinazy Cre?**
3. **Czy ekspresja GFP w komórkach innych niż astrocyty obserwowana jest także w nieobecności kwasu kainowego?**
4. **Jaki może być wpływ tzw. zjawiska *off-target* na wyniki badań EEG, które wskazują na zmniejszoną częstotliwość napadów behawioralnych u myszy z obniżonym poziomem białka Cd44?**

Bardzo interesującą obserwacją u myszy AsKO jest wspominana powyżej obniżona częstość napadów drgawkowych, którym towarzyszą zmiany behawioralne, przy jednoczesnym wzroście częstości występowania napadów niekonwulsyjnych, klasyfikowanych do grupy 0 w skali 0-6. U myszy transgenicznych zaobserwowano również mniejszy przerost astrogleju oraz zmniejszoną w stosunku do grupy kontrolnej dyspersję komórek warstwy ziarnistej zakrętu zębatego. Jak słusznie zauważa doktorantka, jest to zjawisko korzystne, ograniczające zmiany strukturalne w obrębie hipokampa, które zachodzą w wyniku napadów padaczkowych.

Potencjalne mechanizmy prowadzące do zmniejszenia częstości występowania drgawek behawioralnych zostały dobrze przedstawione i przedyskutowane na str. 91. Wśród nich doktorantka wskazuje na możliwe zależności pomiędzy funkcją białka Cd44 w astrocytach a zdolnością do wychwytu glutaminianu oraz syntezy i wydzielania GABA. Na poparcie tej hipotezy przytoczone zostały badania wskazujące na obniżenie ekspresji transportera glutaminianu GLT-1 w odpowiedzi na wzrost ekspresji *Cd44* [odnośnik literaturowy nr 211]. Nie jest jednak wiadomym, czy zachodzi zależność odwrotna, tj. czy obniżenie poziomu białka Cd44 pociąga za sobą zmiany w wychwycie glutaminianu przez astrocytarny transporter GLT-1.

Doktorantka słusznie sugeruje, że zmniejszone synaptyczne wydzielanie glutaminianu w modelu AsKO może być prawdopodobną przyczyną obniżonej częstości drgawek behawioralnych, na co zwraca uwagę w dyskusji na str. 95. Wskazują na to także wyniki przedstawiające zmiany w ultrastrukturze synaps (ryciny 4.25-4.27) oraz doniesienia literaturowe dotyczące funkcji białka ezryny, która oddziałuje z glikoproteiną Cd44 [odnośnik literaturowy nr 215]. Podobnie jak w niniejszej dysertacji, w badaniach nad ezryną wykazano, że jej obniżony poziom w astrocytach zwiększał odległość astrocytu od synapsy oraz zmniejszał ilość kontaktów na linii synapsa-astrocyt, co skutkowało niższym poziomem glutaminianu w szczelinie synaptycznej. Co istotne, nie było to wynikiem zmienionego presynaptycznego wydzielania tego neurotransmitera.

W związku z tym sformułowanie: „*Similarly, the absence of Ezrin decreases the proximity between astrocytes and neurons, as well as the number of astrocyte-synapse contacts, leading to increased glutamate overflow and activation of NMDA receptors [215]*" może sugerować zwiększone wydzielanie glutaminianu i aktywację synaptycznych receptorów N-metylo-D-asparaginianowych (NMDA), choć autorzy tego badania wskazują raczej na zjawisko zwiększonego stężenia glutaminianu w przestrzeni pozasynaptycznej oraz aktywację receptorów NMDA zlokalizowanych poza synapsą. Przypuszczam, że jest to pewien skrót myślowy, gdyż dalsza dyskusja wyników prowadzona jest w sposób klarowny.

W tym miejscu chciałbym zapytać, jakie mechanizmy mogą leżeć u podstaw zwiększonej częstości napadów drgawkowych u myszy AsKO przebiegających bez manifestacji behawioralnych (grupa 0)?

W ogólnej ocenie doktorantka przeprowadziła poprawną, a zarazem interesującą analizę uzyskanych wyników oraz prawidłowo je przedyskutowała w kontekście dostępnych danych literaturowych. Rozprawę dopełnia klarowne podsumowanie i prawidłowo wyciągnięte wnioski. Całość została napisana poprawnym językiem angielskim, w sposób staranny i przemyślany, a liczba błędów edytorskich jest minimalna.

Niewątpliwie godne szczególnego podkreślenia są zarówno ogrom pracy włożonej przez doktorantkę, jak i szeroki wachlarz nowoczesnych metod badawczych z zakresu biologii molekularnej, inżynierii genetycznej, technik immunologicznych oraz analiz mikroskopowych. Ich wykorzystanie wymagało nie tylko zaawansowanej wiedzy, ale również umiejętności praktycznego ich zastosowania.

Doktorantka podjęła się realizacji bardzo ciekawego, ważnego i potrzebnego tematu, osiągnęła postawione cele oraz wykazała się solidnym warsztatem naukowym i szeroką znajomością badanej problematyki. Przedstawiona mi do oceny dysertacja stanowi niewątpliwie oryginalne rozwiązanie istotnego zagadnienia badawczego, a uzyskane wyniki mogą mieć potencjalne zastosowanie w opracowaniu nowych leków przeciwpadaczkowych.

Podsumowując, należy stwierdzić, że przedłożona do oceny rozprawa doktorska Pani mgr inż. Patrycji Kruk 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. Patrycji Kruk do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora.

Prof. dr hab. Dariusz Rakus
Zakład Fizjologii i Neurobiologii Molekularnej
Uniwersytet Wrocławski
ul. Sienkiewicza 21
50-335 Wrocław

Wrocław, 12.03.2025

SEKRETARIAT RADY NAUKOWEJ
WPŁYNĘŁO 13-03-2025

Recenzja rozprawy doktorskiej Pani Patrycji Kruk zatytułowanej

„The role of astrocytic CD44 protein in epileptogenesis"

Przedłożona mi do recenzji rozprawa doktorska dotyczy roli białka CD44 w mechanizmach epileptogenezy. Tematyka ta ma istotne znaczenie nie tylko dla badań podstawowych nad biologią mózgu, ale również dla potencjalnych strategii terapeutycznych w leczeniu padaczki skroniowej.

W pracy podjęto interdyscyplinarne podejście obejmujące analizę molekularną, badania na modelach zwierzęcych oraz hodowlach komórkowych. Szczególnie wartościowe jest zastosowanie technik genetycznych do selektywnej delecji CD44 w astrocytach, co pozwala na ocenę jego roli w kontekście funkcji komórek glejowych oraz jego i ich wpływu na pobudliwość neuronalną.

Temat pracy jest aktualny i wpisuje się w nurt badań nad neurobiologią epilepsji oraz nad potencjalnymi celami terapeutycznymi w tymże schorzeniu. Znaczenie naukowe wyników jest istotne, a uzyskane dane mogą się przyczynić do lepszego zrozumienia mechanizmów plastyczności neuronalnej i regulacji mikrośrodowiska synaptycznego.

Rozprawa jest logicznie napisana, a styl narracji jest klarowny, choć miejscami mogłaby być bardziej zwięzła.

Wprowadzenie zawiera dobrze przedstawione tło naukowe, opisujące rolę CD44 w Ośrodkowym Układzie Nerwowym (OUN). Doktorantka omówiła również mechanizmy glejowo-neuronalne w padaczce, co stanowi solidną podstawę dla przeprowadzonych eksperymentów. Trochę brakuje mi – szczególnie w kontekście Dyskusji wyników – opisania potencjalnego wpływu CD44 na molekularne szlaki związane z powstaniem epizodów epileptycznych; np. na aktywację szlaku PI3K/Akt/mTOR, albo poziom GLT-1.

Metody badawcze zastosowane przez Doktorantkę zostały dobrze dobrane i pozwoliły na szczegółową analizę roli CD44 w OUN. Na szczególną uwagę zasługują:

- badania immunohistochemiczne oraz analiza obrazu, które pozwoliły na ocenę wpływu delecji CD44 na struktury neuronalne i glejowe,
- wymagająca wytrwałości praca nad modelami genetycznymi delecji CD44, umożliwiającymi badanie funkcji astrocytarnego CD44 w epileptogenezie,
- analizy ultrastrukturalne – dostarczające cennych informacji o potencjalnych mechanizmach działania CD44 w hipokampie.

Z punktu widzenia Dyskusji, brakuje trochę analizy ekspresji białek szlaku PI3K/Akt/mTOR praz GLT-1 (IF, WB?) – do ułatwiłoby dyskusję wyników.

Nie jest to jednak uwaga bardzo kluczowa dla oceny rozprawy – realizacja doktoratu jest ograniczona czasowo, a Doktorantka i tak wykazała się ogromną pracowitością; brak tych wyników (jak i niespójności w danych literaturowych dotyczących tego zagadnienia) wskazują na potrzebę dalszych badań w tym kierunku, a więc i istotność zagadnienia.

Uzyskane wyniki Doktorantka przedstawiła w sposób bardzo czytelny.

W rozdziale Dyskusja, Pani Patrycja Kruk dogłębnie – i zasadniczo bardzo klarownie – przedstawiła interpretację wyników w kontekście literatury.

Dyskusja rozpoczyna się intensywną dyskusją wyników uzyskanych podczas tworzenia mysich modeli pozbawionych białka CD44 w astrocytach. Ten fragment dla czytelnika oczekującego na odpowiedź „dlaczego zmiany poziomu CD44 w astrocytach mają wpływ na ilość i wielkość epizodów epileptycznych" jest najmniej intersujący, ale jest bezcenna metodologicznie, a również podkreśla ogrom pracy włożonej przez Doktorantkę w wykonanie zaplanowanych badań.

Pewne kwestie poruszone w Dyskusji wydają się jednak nie do końca klarowne dla czytelnika, który nie jest ekspertem w biochemii/biologii molekularnej białka CD44, jak i zjawiska epilepsji.

Otóż opis roli mTOR w epileptogenezie sugeruje się, że CD44 może wpływać na stężenie glutaminianu poprzez zmianę ekspresji GLT-1 – ta hipoteza jest jasno przedstawiona: *„...increased CD44 expression in astrocytes has been associated with a reduction in the glutamate transporter-1 (GLT-1) on the cell membrane and a decrease in glutamate transporter current [211]. This suggests that astrocytes with elevated CD44 expression following KA-induced status epilepticus may be less efficient at buffering glutamate compared to non-reactive astrocytes.*". Doktorantka zakłada więc, że CD44 może wpływać na poziom GLT-1 poprzez modulację aktywności mTOR indukowanej przez

aktywację szlaku PI3K/Akt (i tutaj właśnie przydałyby się „barwienia" IF owych białek i ich fosfoform, jako i GLT-1).
I właśnie owa część hipotezy jest niejasna. W skrócie: CD44 obniża poziom GLT-1 poprzez aktywację PI3K/AKT/mTOR (bardzo przydałby się schemat pokazujący takową zależność). Kanoniczny model transdukcji sygnału zakłada jednakże, że zwiększona aktywność PI3K zwiększa aktywność mTOR, a więc i poziom GLT-1.
Drugą niejasnością jest eksponowanie roli poliamin jako źródła GABA. Czy to jednak nie glutaminian jest podstawowym źródłem GABA w mózgu? Czy istnieją doniesienia wiążące pobudzenie/ilość CD44 z aktywnością/poziomem ekspresji dekarboksylazy glutaminianu?

Rozprawa doktorska Pani Patrycji Kruk stanowi rzetelną i wartościową pracę naukową, która wnosi istotny wkład w badania nad rolą CD44 w epileptogenezie. W szczególności podkreślić należy dogłębne, wymagające wiedzy eksperckiej i bardzo czasochłonne doświadczenia mające na celu stworzenie modelu organizmu pozbawionego białka CD44.
Mimo kilku niejasności w interpretacji wyników, praca ma wysoką wartość merytoryczną i spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim.

Na tej podstawie stwierdzam, że rozprawa doktorska spełnia warunki określone w Art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. „Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce" (Dz. U. 2023 poz. 742 z późn. zmianami). W związku z powyższym, wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Biologii Doświadczalnej o dopuszczenie Pani Patrycji Kruk do dalszych etapów postepowania w sprawie nadania stopnia doktora.

Jednocześnie zwracam się do Rady Naukowej Dyscypliny z propozycją nagrodzenia rozprawy.

Wrocław, 12.03.2025

Prof. dr hab. Dariusz Rakus

UNIWERSYTET WARSZAWSKI

Wydział Biologii
Zakład fizjologii zwierząt
Pracownia Neurobiologii Molekularnej
Dr hab. Magdalena Dziembowska, prof. ucz.

Warszawa, 2 maja 2025

Recenzja pracy doktorskiej mgr inż. Patrycji Kruk pt.
"The role of astrocytic CD44 protein in epileptogenesis"

Przedstawiona do recenzji praca doktorska mgr inż. Patrycji Kruk została wykonana pod kierunkiem dr hab. Joanny Dzwonek w Instytucie Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego w Warszawie.

W ostatnich latach w neurobiologii nastąpiły przełomy technologiczne, takie jak rozwój technologii CRISPR/Cas9 która pozwala na precyzyjną edycję genomów tak w całym organizmie jak i w specyficznej populacji komórek (wykorzystując nowoczesne wektory wirusowe). Dostępność tych technologii pozwoliła na zadawanie pytań o udział konkretnych białek ulegających ekspresji w konkretnym typie komórek w mózgu na procesy patologiczne takie jak rozwój epilepsji. Tego rodzaju badania funkcjonalne są ważne dla poszukiwania nowych celów terapeutycznych.

W swojej pracy doktorskiej mgr inż. Patrycja Kruk opracowała, a następnie wykorzystała model myszy z delecją białka CD44 w astrocytach, aby odpowiedzieć na pytanie o jego udział w epileptogenezie. Autorka pracy przeprowadziła szereg doświadczeń, które ostatecznie doprowadziły do udowodnienia kluczowej roli astrocytarnego białka CD44 w epileptogenezie. Delecja białka CD44 w astrocytach zmniejszała charakterystyczne zmiany strukturalne hipokampu takie jak reaktywna astroglejoza, bocznicowanie włókien kiciastych i towarzyszące mu rozproszenie komórek ziarnistych. Zmiany strukturalne były także obserwowane na poziomie synaps. Opisane przez Autorkę pracy wyniki wskazują na potencjalną możliwość wykorzystania receptora CD44 jako celu terapeutycznego w leczeniu lekoopornej postaci padaczki skroniowej.

ul. Ilji Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa
tel.: 22 55 41 104, faks: 22 55 41 106
e-mail: dziekan@biol.uw.edu.pl
http://www.biol.uw.edu.pl

Praca ma klasyczną budowę i składa się ze wstępu, rozdziału opisującego metody, wyniki oraz z dyskusji. Bibliografia zawiera 243 cytowania. Praca jest napisana w języku angielskim w sposób bardzo sprawny i na ile mogę to ocenić, w sposób poprawny i jasny.

We wstępie Autorka wprowadza czytelnika w tematykę pracy opisując epilepsję i jej możliwe przyczyny, budowę anatomiczną formacji hipokampu oraz wpływ ataków padaczkowych na jej zmianę. Kolejna część dotyczy struktury i funkcji astrocytów, ich roli w epiletogenezie oraz omawia koncepcję synapsy trójdzielnej, w której ważnym elementem strukturalnym jest właśnie wypustka astrocytarna. W końcu dowiadujemy się o strukturze receptora CD44 i jego funkcji w różnych komórkach. W tej części wstępu zabrakło mi systematycznie uporządkowanych informacji o tym co wiadomo na temat ekspresji CD44 w komórkach układu nerwowego. Autorka pisze o tym że CD44 powszechnie używane jako marker astrocytów i jest obecne w komórkach ziarnistych móżdżku oraz jego braku w neuronach korowych dorosłej myszy, nie wspomina natomiast o hipokampie, która to struktura jest przedmiotem jej badań.

Bardzo krótki rozdział poświęcono CD44 w epilepsji. Informacje o stanie wiedzy są bardzo ogólne, np. na stronie 32 czytamy że badania kliniczne wskazują na wzrost CD44 u pacjentów z epilepsją w porównaniu do grupy kontrolnej. W jakiej tkance oznaczano poziom białka CD44, w surowicy/osoczu krwi? Czy może w mózgach *post mortem*? Podobnych „skrótów myślowych" jest w pracy więcej.

Nie rozumiem dlaczego we wstępie znalazł się rozdział opisujący wykorzystane metody, moim zdaniem należałoby go przenieść do sekcji materiały i metody.

Ogólnie uważam, że wstęp w sposób wystarczający wprowadza czytelnika do zagadnień opisanych w wynikach, zawiera wiele pomocnych, dobrze dobranych i estetycznych schematów ułatwiających zrozumienie wyników pracy.

Sekcja Materiały i Metody jest dostatecznie wyczerpująca, a jednocześnie odpowiednio zwięzła i nie mam do niej uwag krytycznych. Autorka pracy szczegółowo opisała wykorzystane linie zwierząt transgenicznych i ich genotypowanie, procedury chirurgiczne, domózgowe podawanie wirusów oraz kwasu kainowego. Następnie doktorantka opisuje analizę nagrań EEG, stosowane metody biochemiczne oraz immunofluorescencję i wreszcie przygotowanie próbek do obrazowania w mikroskopie elektronowym.

Praca jest bogata metodycznie i widać, że do jej wykonania Autorka musiała opanować pracę ze zwierzętami doświadczalnymi, zaawansowane procedury takie jak domózgowe

podawanie wektorów AAV, implantację elektrod i nagrania EEG, przygotowanie tkanek do analiz, immunofluorescencję i obrazowanie w mikroskopie konfokalnym, ale także zaawansowane metody mikroskopii elektronowej 3D.

Wyniki są opisane w sposób klarowny a ryciny przygotowano z należytą starannością. W pierwszej części tego rozdziału Autorka opisuje opracowanie nowego modelu myszy transgenicznej do indukowanej tamoksyfenem delecji genu kodującego białko CD44 specyficznie w astrocytach. Niestety, pomimo tego, że eksperyment i krzyżowanie myszy transgenicznych zaplanowano poprawnie, nie udało się uzyskać wyciszenia ekspresji DC44 w mózgu myszy po podaniu tamoksifenu.

Po tych niepowodzeniach Autorka pracy postanowiła zmienić strategię i regulować wyciszenie genu *CD44* przy pomocy wektorów wirusowych AAV5 z promotorem GFAP, specyficznym dla astrocytów wstrzykiwanych bezpośrednio do zakrętu zębatego hipokampa. Dużego nakładu pracy wymagało z całą pewnością samodzielne stworzenie i przetestowanie niezbędnych narzędzi *in vitro* i *in vivo* do mikroiniekcji przygotowanych wektorów wirusowych. Tutaj chciałam wyrazić mój podziw dla determinacji i ogromnej pracy wykonanej przez doktorantkę pomimo niepowodzeń na początkowym etapie realizacji projektu, co z pewnością było demotywujące. Jednak nowe podejście eksperymentalne okazało się trafne i pozwoliło uzyskać wyciszenie CD44 w astrocytach, a następnie zbadać jego wpływ na rozwój epilepsji wywołanej domózgowym podaniem kwasu kainowego. Już po 4 godzinach Autorka zaobserwowała znaczny wzrost poziomu fluorescencji CD44 oraz zmianę w morfologii astrocytów barwionych przeciwciałem GFAP.

Uzyskane wyniki wskazują na obniżenie liczby napadów padaczkowych u myszy z obniżoną ekspresja CD44 w astrocytach analizowanych dzięki nagraniom EEG. W komórkach CD44 negatywnych zaobserwowano redukcję astroglejozy indukowanej przez kwas kainowy.

Na rycinie 4.20 Autorka przedstawia barwienia warstwy ziarnistej zakrętu zębatego hipokampa (warstwa ta składa się głównie z ciał neuronów) wskazujące na to, że transdukcji wirusem AAV uległy komórki neuronalne, natomiast w warstwie molekularnej widać wyraźnie glej. Moje pytanie w związku z opisanymi wynikami dotyczy tego czy badany efekt jest zależny wyłącznie od komórek glejowych? Czy wystarczy zahamowanie ekspresji CD44 w gleju aby obserwować tak duży efekt na gęstość synaps i objętość gęstości postsynaptycznej?

Dyskusja zaczyna się od dobrze napisanego podsumowania uzyskanych wyników. Jednym z bardziej spektakularnych wyników uzyskanych przez Doktorantkę jest zahamowanie

tzw. "reaktywnej astroglejozy", indukowanej przez podanie kwasu kainowego, dzięki wyłączeniu ekspresji CD44 w astrocytach. W dyskusji Autorka pracy pisze „CD44 may play a role in astrogliosis by influencing astrocyte morphology" (str. 92). Czy Autorka mogłaby zaproponować w jaki sposób wzrost ekspresji CD44 indukowany w epilepsji mógłby wpłynąć na zmiany morfologiczne komórek glejowych?

Sposób dyskusji uzyskanych wyników wskazuje na dużą dojrzałość naukową doktorantki. Dyskusję uważam za wyczerpującą.

Przedłożona mi do oceny **rozprawa doktorska** mgr inż. Patrycji Kruk **prezentuje ogólną wiedzę teoretyczną osoby ubiegającej się o nadanie stopnia doktora w dyscyplinie nauki biologiczne.** Uzyskane przez Autorkę pracy wyniki są oryginalne i wskazują na ważną rolę astrocytarnego białka CD44 w epileptogenezie. W związku z tym w mojej ocenie p**rzedstawiona rozprawa doktorska spełnia kryterium oryginalnego rozwiązania problemu naukowego.** Ponadto na podstawie zaprezentowanych w rozprawie wyników badań mogę stwierdzić, że **Doktorantka wykazuje umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej.**

Podsumowując stwierdzam, że przedłożona mi do oceny 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.). W związku z powyższym, wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Biologii Doświadczalnej o dopuszczenie mgr inż. Patrycji Kruk do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora.

dr hab. Magdalena Dziembowska, prof. ucz

Magdalena Dziembowska

Wydział Biologii Uniwersytetu Warszawskiego