



UNIWERSYTET
MIKOŁAJA KOPERNIKA
W TORUNIU

Wydział Nauk Biologicznych
i Weterynaryjnych

Prof. dr hab. Justyna Rogalska,
Katedra Fizjologii Zwierząt i Neurobiologii
Wydział Nauk Biologicznych i Weterynaryjnych
Uniwersytet Mikołaja Kopernika
ul. Lwowska 1
87-100 Toruń
e-mail: rogal@umk.pl

O C E N A

rozprawy doktorskiej Pani magister Anny Kobrzyckiej pt.

„Óśrodkowe mechanizmy kompensacji długotrwałego upośledzenia immunosensorycznej i immunosupresorowej funkcji nerwu błędnego”

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska poświęcona została badaniu mechanizmów, które umożliwiają komunikację między układem nerwowym i immunologicznym po wyłączeniu jednego z głównych szlaków przekazywania informacji czyli uszkodzeniu nerwu błędnego. Wartość dysertacji podnosi fakt, iż badania zostały wykonane w ramach projektu badawczego finansowanego przez NCN, którego kierownikiem był promotor dysertacji dr hab. Marek Wieczorek, prof. UŁ.

W skład przedstawionej do oceny rozprawy doktorskiej wchodzi praca przeglądowa, opublikowana w czasopiśmie Kosmos, publikacja opublikowana w czasopiśmie J Neuroinflammation o wysokim impact factor 8,322 i dwa manuskrypty, które ze względu na wartość opisanych badań również powinny zostać opublikowane w wysokopunktowanych czasopismach. A zatem, zarówno sama tematyka badań, jak też część wyników wchodzących w skład rozprawy zostały już pozytywnie ocenione przez recenzentów tych publikacji. Warto też podkreślić, że Pani mgr Kobrzycka jest pierwszym autorem we wszystkich wymienionych pracach.

Konsekwencje uszkodzenia czy obniżonej aktywności nerwu błędnego obejmują szeroki zakres zjawisk, dotyczą różnych układów czy narządów i tym samym potwierdzono, że mogą stanowić ważny element etiologii wielu schorzeń np. 1) neurodegeneracyjnych takich jak choroba Alzheimera, choroba Parkinsona i epilepsja oraz 2) chorób o podłożu zapalnym: choroba Crohna i reumatoidalne zapalenie stawów. A zatem znalezienie alternatywnych mechanizmów kompensujących tego typu deficyt może być istotnym elementem opracowania skutecznych metod terapeutycznych tych schorzeń. Badania opisane w dysertacji wpisują się w ten nurt badawczy.

Publikacje i manuskrypty wchodzące w skład rozprawy zostały podsumowane w komentarzu autorskim. Układ tej części rozprawy jest typowy dla prac doświadczalnych. Komentarz został podzielony na 7 rozdziałów: 1. Wprowadzenie, 2. Cele i założenia badań, 3. Metody badawcze, 4. Omówienie wyników, 5. Wnioski, 6. Streszczenie i 7. Piśmiennictwo. Cytowana literatura jest bogata (150 pozycji!), co dowodzi dogłębnej analizy badanego tematu przez doktorantkę. Na szczególne podkreślenie zasługuje estetyka przygotowania rozprawy: przejrzysty, poprawny język naukowy i schematy o dużej wartości informacyjnej.

We wstępie rozprawy doktorantka bardzo czytelnie i jasno przedstawia problem badawczy, zwracając szczególną uwagę na te elementy, które stały się podstawą do sformułowania celów pracy. Autorka omawia mechanizm odpowiedzi organizmu na infekcje czy urazy mechaniczne, która obejmuje rozwój stanu zapalnego i behavior chorobowy, tzw. sickness behavior. Ponadto przedstawia rolę nerwu błędnego w komunikacji pomiędzy układem odpornościowym i nerwowym i konsekwencje jego uszkodzenia. We wstępie znalazł się również opis dotychczasowych badań, które stanowiły podstawę do sformułowania hipotezy o istnieniu alternatywnych dróg komunikacji między układem nerwowym i immunologicznym.

Prezentację wiedzy doktorantki na temat funkcji nerwu błędnego stanowi pierwsza z cyklu prac wchodzących w skład rozprawy - praca przeglądowa. W pracy tej dokonano przeglądu dotychczasowych badań nad udziałem nerwu błędnego w mechanizmach neuroimmunokomunikacji oraz przedstawienie anatomicznych i fizjologicznych przesłanek o jego aktywności immunosensorycznej. Tę część można uznać za szerokie wprowadzenie w tematykę badań eksperymentalnych zawartych w pozostałych pracach wchodzących w skład rozprawy.

Wstęp w logiczny sposób prowadzi do kolejnej części rozprawy, czyli założeń i celów podjętych przez doktorantkę badań. Nadrzędnym, głównym celem pracy doktorskiej było określenie czy istnieją przesłanki wskazujące na istnienie mechanizmów kompensujących brak immunosensorycznych i immunosupresorowych funkcji nerwu błędnego, obserwowanych trzydzieści dni po zabiegu wagotomii podprzeponowej. Autorka wskazuje, że ten cel został osiągnięty badaniami opisanymi w pracy nr 2. Następnie wyróżniono 5 celów szczegółowych do celu głównego, również wskazana jest praca nr 2. Na końcu są wyszczególniono cele dodatkowe, i tu ich osiągnięciu posłużyły badania opisane w pracy nr 3 i 4.

Po przeczytaniu publikacji nie mam wątpliwości, że jest to spójny cykl dotyczący konsekwencji uszkodzenia nerwu błędnego i wytypowania potencjalnych szlaków alternatywnych dla regulacji stanu zapalnego i sickness behavior. Według mnie cel główny powinien odnosić się do wszystkich badań, które tworzą rozprawę doktorską, a cele szczegółowe do kolejnych cykli badawczych prezentowanych w kolejnych pracach. Wyróżnienie któregoś aspektu przeprowadzonych badań jest kwestia subiektywną, dla autorki wyraźnie kluczowe są badania opisane w pracy nr 2, a dla mnie np. w pracy nr 3. Generalnie cele są sformułowane poprawnie, natomiast moje zastrzeżenia dotyczą przyjętego spojrzenia na badania na etapie formułowania celów, tzn. uznanie że praca numer 2 jest główna, najważniejsza, a pozostałe są dodatkowe. Według mnie zasadne byłoby podkreślenie w celach rozprawy spójności przeprowadzonych badań, która jak wspomniałam nie budzi wątpliwości i została wykazana w omówieniu wyników, gdzie widać wyraźnie, że badania przedstawione w poszczególnych pracach uzupełniają się wzajemnie i dają pełen obraz zjawisk, które mają miejsce po wagotomii podprzeponowej.

Metodyka przeprowadzonych badań, nie budzi zastrzeżeń. Były to badania prowadzone in vivo na modelu szczurzym. Zwierzęta zostały poddane wagotomii podprzeponowej, po eutanazji zwierząt, uzyskany materiał biologiczny poddano analizom z zastosowaniem takich technik jak, HPLC, RT-qPCR, Elisa, analiza mikromacierzowa. U części zwierząt przeprowadzono analizę behavioru w teście uniesionego labiryntu krzyżowego (elevated plus maze, EPM).

Dobrze przemyślane, logicznie zaplanowane badania, a także ich konsekwentna i precyzyjna realizacja, przyniosły spodziewane efekty w postaci interesujących wyników. Autorka w sposób spójny, logiczny omówiła je w komentarzu autorskim, konsekwentnie do podjętych zadań badawczych. Natomiast chciałabym zwrócić uwagę na tę wersję rozbudowaną czyli publikację, które czyta się z ogromną przyjemnością i uznaniem dla bardzo dobrze poprowadzonej argumentacji dla wyprowadzanych wniosków ze zrealizowanych badań.

Według mnie szczególnie interesującym aspektem przeprowadzonych badań jest mechanizm regulacji stężenia kortykosteronu po wagotomii podprzeponowej. Stężenie

kortykosteronu jest markerem aktywności osi podwzgórzowo-przysadkowo-nadnerczowej (osi HPA). Podczas infekcji wzrost uwalniania kortykosteronu świadczy o uruchomieniu ważnego mechanizmu przeciwzapalnego czyli o wzroście aktywności osi HPA. Jest to kluczowe zjawisko w przebiegu infekcji - służące wygaszaniu wzmożonej aktywności układu odpornościowego, która jest jak najbardziej zjawiskiem protekcyjnym, jednak długotrwałe utrzymywanie się takiego stanu jest niekorzystne i stwarza ryzyko sepsy, albo też może skutkować rozwojem chorób autoimmunologicznych. Wagotomia podprzeponowa skutkuje obniżeniem poziomu kortykosteronu w pierwszych dniach po zabiegu. Natomiast doktorantka dowiodła, że pomimo wyłączenia szlaku komunikacyjnego z udziałem nerwu błędnego 30 dni po wagotomii u większości zwierząt zaobserwowano przywrócenie pełnej aktywności wydzielniczej osi HPA. Obserwacja ta jest zgodna z hipotezą o intensyfikujących się wraz z upływem czasu po zabiegu wagotomii, alternatywnych mechanizmach neuroimmunokomunikacji. Weryfikacją tych mechanizmów kompensacyjnych autorka zajęła się w kolejnym etapie badań i okazało się, że utrzymanie wzmożonej aktywności osi HPA odbywa się z udziałem transmisji GABA-ergicznej, która jest nasiloną w podwzgórzu po wagotomii. Autorka sugeruje, że w wyniku wzrostu natężenia tej sygnalizacji dochodzi do odblokowania uwalniania korykoliberyny (CRH) w podwzgórzu i ostatecznie na drodze sprzężeń zwrotnych - podniesienie poziomu kortykosteronu we krwi podczas stanu zapalnego u zwierząt z grupy poddanej wagotomii w stopniu podobnym do tego u zwierząt kontrolnych. Pojawia się pytanie o przyczynę wzrostu transmisji GABAergicznej po uszkodzeniu nerwu błędnego. Doktorantka wskazuje na zmienioną aktywność ciał migdałowych jako źródła tego zjawiska. Jest to ciekawa hipoteza i chętnie poznam argumenty, które wskazują na taką interpretację opisanych zjawisk.

Kolejnym ważnym aspektem pracy jest stwierdzenie wzrostu poziomu prostaglandyny 2 (PGE₂, głównego produktu indukowanych podczas stanu zapalnego cyklooksygenaz) po indukcji stanu zapalnego u zwierząt poddanych wagotomii w porównaniu do grupy kontrolnej. Prostaglandyna ma kluczowe dla modulacji aktywności układu immunologicznego. Stąd odkrycie wzrostu PGE₂ po wagotomii i jednocześnie obserwacja zmienionego profilu cytokinowego świadczą o tym, że reakcja zapalna przebiega w inny sposób niż u zwierząt kontrolnych. Według autorki szlaki komunikacyjne z udziałem prostaglandyny 2 mogą kompensować brak sygnału o stanie zapalnym, który w fizjologicznych warunkach byłby przekazywany do OUN za pośrednictwem nerwu błędnego.

Analiza zmian w neurotransmisji monoaminergicznej wywołanych uszkodzeniem nerwu błędnego wykazała, że w warunkach nieseptycznych, u zwierząt poddanych wagotomii dochodzi do obniżenia stężenia noradrenaliny i dopaminy w pniu mózgu, obniżenia stężenia serotoniny w korze przedczołowej oraz wzrostu stężenia serotoniny w korze ruchowej w stosunku do zwierząt z grupy kontrolnej. Co ciekawe indukcja stanu zapalnego prowadzi do normalizacji poziomu wymienionych neuroprzekaźników, jedynie obniżony poziom serotoniny autorka stwierdziła w ciałach migdałowych. I ten efekt wiąże z obserwowanymi zmianami behawioru w tej grupie zwierząt.

Do analizy zmian behawioru po wagotomii podprzeponowej doktorantka wybrała podwyższony labirynt krzyżowy, który jak sama autorka wskazuje służy do oceny trzech aspektów behawioru: aktywności lokomotorycznej, podejmowania zachowań ryzykownych i lęku.

U zwierząt z uszkodzonym nerwem błędnym w warunkach infekcji stwierdzono obniżoną aktywność lokomotoryczną i zmniejszoną liczbę zachowań ryzykownych – na poziomie zbliżonym do obserwowanego u zwierząt kontrolnych, co wskazuje, że behawior chorobowy rozwinął się prawidłowo. Wielokrotnie w pracy i publikacjach autorka odnosi uzyskane wyniki w teście uniesionego labiryntu krzyżowego do oceny zachowań socjalnych, nawet taki wniosek zostaje sformułowany, który mówi o tym, że obserwowane zmiany są spowodowane uwrażliwieniem układu nagrody na bodźce socjalne. Uważam, że wyniki uzyskane w EPM jak najbardziej mogą być wskaźnikiem rozwoju sickness behavior, natomiast wyciąganie wniosków dotyczących zachowań socjalnych byłoby uprawnione jedynie na podstawie testu, który jest dedykowany do analizy zachowań społecznych, EPM takim testem nie jest. Natomiast w związku z tym, że celem pracy była analiza przebiegu stanu zapalnego, funkcji

układu limbicznego i rozwoju sickness behavior jako reprezentacji zmian w układzie limbicznym wybór testu PEM jest jak najbardziej prawidłowy. Natomiast żeby analizować zachowania socjalne należałoby wybrać inny test, o czym autorka sama w pracy wspomina.

Ostatnim aspektem badań doktorantki była ocena wrażliwości na ból u zwierząt po wagotomii na podstawie poziomu met-enkefalin w krwi, endogennego środka przeciwbólowego. U zwierząt kontrolnych iniekcja LPS spowodowała wzrost stężenia met-enkefalin w krwi, natomiast nie stwierdzono takiego efektu u zwierząt, u których uszkodzono nerw błędny. Ten wynik wskazuje na zaburzenie endogennego mechanizmu przeciwbólowego u tych zwierząt, co może skutkować nasilonym behawiorem chorobowym.

Dyskusja wyników świadczy o dużej wnikliwości doktorantki. Pani mgr Kobrzycka dowiodła, że doskonale porusza się w zagadnieniach związanych z tematem dysertacji i w tej części pracy elegancko w oparciu o literaturę tłumaczy uzyskane wyniki.

Podsumowaniem pracy mgr Kobrzyckiej jest 6 wniosków, uzasadnionych uzyskanymi wynikami, które potwierdzają zrealizowanie postawionych celów badawczych. Tutaj jeden komentarz, rada dla doktorantki - w sytuacji kiedy wyniki są jednoznaczne powinno się w wniosku wskazywać kierunek zmiany zamiast stwierdzać tylko, że zmiana miała miejsce.

Czytając pracę znalazłam kilka literówek czy skrótów myślowych, na które z obowiązku recenzenta muszę zwrócić uwagę. Przytoczę kilka przykładów:

- „stan wzbudzenia układu odpornościowego” – wzbudzenie jest bardziej odpowiednie w odniesieniu do aktywności elektrycznej komórek, w przypadku układu odpornościowego można użyć wielu innych terminów, chociażby „stan aktywności”.

- na str 22 autorka pisze, że „nie zaobserwowano znaczącego wpływu zabiegu wagotomii podprzeponowej na poziom cytokin w krwi w warunkach niesepetycznych w żadnej z grup eksperymentalnych (SH, VG). Grupa SH nie była poddawana wagotomii podprzeponowej.

- dla kortykoliberyny doktorantka używa skrótu CRF- corticotropin releasing factor, ten skrót był używany, kiedy właściwości tej substancji nie były dokładnie znane, obecnie wiemy, że jest to hormon, a zatem bardziej prawidłowe jest używanie skrótu CRH – corticotropin releasing hormone.

To są drobne uchybienia, które nie wpływają na moją bardzo wysoką ocenę dysertacji.

W podsumowaniu chciałabym wyraźnie podkreślić, że mgr Anna Kobrzycka wynikami swojej pracy zrealizowała zamierzone cele. Było to możliwe dzięki dobrze zaplanowanym badaniom, a także ich konsekwentnej realizacji z użyciem różnorodnych technik i metod badawczych. Jak już wspomniałam na początku osłabiona aktywność nerwu błędnego występuje w przebiegu wielu chorób i zaburzeń, a zatem określenie jak organizm kompensuje brak immunomodulatorowych funkcji nerwu błędnego, jakie szlaki neuronalne czy metaboliczne są uruchamiane może stanowić podstawę do wytypowania nowych miejsc uchwytu dla leków. Ponadto, opisanie wpływu wagotomii podprzeponowej na neurotransmisję w strukturach związanych z emocjami i związanym z nimi sickness behavior, wydaje się szczególnie ważne w kontekście badań nad chorobami i zaburzeniami psychicznymi, które mogą mieć podłoże zapalne.

Badania przeprowadzone przez doktorantkę są bardzo interesujące i nowatorskie, przedstawiają zupełnie nowe spojrzenie na procesy indukowane uszkodzeniem, nie tyle skupiając się na negatywnych konsekwencjach co na endogennych mechanizmach adaptacyjnych, kompensacyjnych, które są uruchamiane w sytuacji zagrożenia. I co istotne poznanie tych procesów otwiera drogę do poszukiwania nowych rozwiązań terapeutycznych.

Przedstawione wyniki w istotny sposób uzupełniają istniejącą wiedzę wnosząc zupełnie nowe elementy w zrozumienie długoterminowych konsekwencji uszkodzenia nerwu błędnego, i co w moim odczuciu ważniejsze wskazanie innych możliwych dróg komunikacji pomiędzy układem nerwowym i immunologicznym. Ponadto rozprawa pozwala stwierdzić, że doktorantka posiada ogólną wiedzę teoretyczną w dyscyplinie biologia i umiejętności samodzielnego prowadzenia pracy badawczej.

Konkludując, uważam, że rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 13 ust. z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 z późn. zm.) i zwracam się do Komisji Uniwersytetu

Łódzkiego do spraw stopni naukowych w dyscyplinie nauki biologiczne o nadanie Pani mgr Annie Kobrzyckiej stopnia doktora w dyscyplinie nauki biologiczne.

Ze względu na bardzo wysoką jakość przedstawionych badań, ich znaczenie aplikacyjne, także ogromny nakład pracy, jaki doktorantka włożyła zarówno w realizację badań, jak również w ich opracowanie merytoryczne wnioskuję Szanownej Komisji o wyróżnienie rozprawy. Badania zrealizowane przez p. Kobrzycka mają charakter innowacyjny i podobnie jak pierwsza z prac eksperymentalnych dysertacji, tak również pozostałe dwie mają szansę na publikację w renomowanych czasopismach naukowych.



Prof. dr hab. Justyna Rogalska

Toruń, dnia 10. kwietnia 2022