



UNIWERSYTET MARII CURIE-SKŁODOWSKIEJ W LUBLINIE

Wydział Biologii i Biotechnologii

Dr hab. Bożena Pawlikowska-Pawłęga, prof. UMCS

Lublin 29.05.2023

Katedra Anatomii Funkcjonalnej i Cytobiologii

Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie

Ul. Akademicka 19, 20-033 Lublin

Recenzja

Rozprawy doktorskiej Pana mgr Macieja Golana pt.: „ Analiza histologiczna i bioinformatyczna kluczowych markerów oligodendrocytów w wybranych obszarach mózgu człowieka i psa”

Pan mgr Maciej Golan wykonał pracę w Zakładzie Histologii i Embriologii, Kolegium Nauk Medycznych, Uniwersytetu w Rzeszowie pod kierunkiem Pani dr hab. n. wet. Agaty Wawrzyniak, prof. Uczelni oraz promotora pomocniczego dr hab. inż. Sabastiana Piłsyka z Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN w Warszawie

Ocena merytoryczna pracy

Przedstawiona mi do recenzji praca miała na celu ocenę lokalizacji, morfologii oraz gęstości oligodendrocytów w mózgowiu człowieka (*Homo sapiens*) i psa (*Canis lupus familiaris*). Autor dokonał również bardzo ciekawej i nowatorskiej analizy bioinformatycznej markerów badanych komórek, w ujęciu ewolucyjnym. Badania przeprowadzono w trzech obszarach mózgu tj.: w płacie czołowym, hipokampie oraz spoidle wielkim. Doświadczenia przeprowadzono pod kątem dystrybucji i gęstości oligodendrocytów we wskazanych obszarach ośrodkowego układu nerwowego, histochemicznej analizy obecności jonów żelaza w badanych komórkach oraz pod kątem oceny demielinizacji i

dysmielinizacji. W badaniach dokonano również immunodetekcji, kluczowego dla procesów tworzenia osłonek mielinowych, zasadowego białka mieliny (MBP). W ramach dysertacji Autor przeprowadził analizy filogenetyczne białkowych markerów OLG kręgowców: mielinowej glikoproteiny oligodendrocytów (MOG), zasadowego białka mieliny oraz ferrytyn (FT). Oligodendrocyty to małe komórki należące do neurogleju. Wytwarzają osłonki mielinowe w ośrodkowym układzie nerwowym stąd też zazwyczaj są zlokalizowane wzdłuż włókien nerwowych. Magazynują żelazo, co jest bardzo ważne dla kluczowych procesów metabolicznych mózgu. Wspomagają także proces wydłużania aksonów. Do tej pory w pracach dotyczących OLG, brakowało informacji i ujęcia porównawczego w kontekście morfologii, gęstości czy rozmiaru badanych komórek u człowieka i psa. Podobnie, nieznana była wiedza odnosząca się do analizy bioinformatycznej markerów OLG, w ujęciu ewolucyjnym. Równocześnie zaburzenia w zarządzaniu żelazem czy tworzeniu osłonek mielinowych są istotne w chorobach neurologicznych czy neurodegeneracyjnych. Do tej pory OLG badano głównie na myszach i szczurach. Niewiele jest prac dotyczących tej tematyki u człowieka. Z kolei pies jako model badawczy i organizm o długim okresie życia przebywający w antropogennym środowisku jest bardzo dobrą alternatywą dla gryzoni i odzwierciedla wpływ cywilizacji na organizm. Dlatego też podjęcie badań uważam za ważne, celowe i uzasadnione.

Doktorant w pracy, stosując metodę Klüvera-Barrery, wykazał brak różnic morfologicznych pomiędzy kobietami i mężczyznami oraz pomiędzy samcami i samicami u psów. Z kolei cytoarchitektonika mózgowia była zachowana w obszarze LF u kobiet i mężczyzn gdzie obserwowano 6 warstw. Oligodendrocyty towarzyszyły astrocytom oraz naczyniom krwionośnym. Podobnie, w preparatach z materiału psiego odnotowano obecność sześciu warstw. W obszarze hipokampa, w obu modelach badawczych, obserwowano cztery pola CA1- CA4 a oligodendrocyty występowały pojedynczo lub w parach. Charakterystyczne rzędy po kilka lub kilkanaście komórek znajdowano w obszarze ciała modelowego. Impregnacja solami srebra umożliwiła obserwacje rozmieszczenia i lokalizacji OLG. Autor Dysertacji, odnotował, we wszystkich badanych preparatach u ludzi i psów, podobne rozmieszczenie oligodendrocytów. W preparatach nie było różnic w morfologii oraz lokalizacji OLG w badanych obszarach. Histochemiczna metoda wykrywania obecności żelaza uwiarygodniła brązowy produkt reakcji w cytoplazmie i wypustkach OLG. Przy czym w obszarach słabo zmielinizowanych (LF oraz Hip) żelazopozytywne oligodendrocyty wykazywały podobny wzór rozmieszczenia jak na skrawkach impregnowanych solami srebra. Ciekawe było zastosowanie barwienia immunohistochemicznego z użyciem przeciwciał przeciwko zasadowemu białku mieliny. W preparatach obserwowano produkt reakcji w OLG oraz włóknach nerwowych zmielinizowanych we wszystkich badanych obszarach mózgowia. Jednocześnie intensywność i rozkład MBP-pozytywnych OLG pokrywał się ze wzorem lokalizacji obserwowanej w metodzie srebrowej, histochemicznej czy przy

zastosowaniu metody Nissla i Klüvera -Barrery. Cenne byłoby jednak, wykonanie dodatkowych testów określających poziom ekspresji tego białka w badanych rejonach ośrodkowego układu nerwowego, na przykład metodą Western Blot. Z pewnością dostarczyłoby to dodatkowych informacji, a być może wykazałoby różnice ilościowe pomiędzy trzema obszarami badawczymi ale też pomiędzy mężczyznami i kobietami oraz samcami i samicami psa. Zastosowana analiza morfometryczna pozwoliła określić liczbę OLG w badanych obszarach mózgowia kobiet i mężczyzn oraz samic i samców psów. Autor nie obserwował istotnych różnic pomiędzy badanymi obszarami mózgowia. Jedynie u psów w obszarze LF stwierdzono statystycznie istotne różnice pomiędzy samicami i samcami. Szkoda, że we wnioskach ten aspekt badań nie został ujęty. Jest to bowiem obszar związany z precyzyjnym przetwarzaniem informacji. Bardzo nowatorskie było przeprowadzenie, przez Dysertanta, analiz bioinformatycznych, co wzbogaciło pracę o nowe i cenne doniesienia naukowe. Autor wykazał, że FT kręgowców można podzielić na sześć podrodzin a ferrytyny powstawały w odpowiedzi na zmieniające się warunki środowiska. Z kolei ekspresję białka MOG obserwuje się w różnych narządach u ssaków, jedynie u człowieka w OUN w oligodendrocytach. Bardzo ciekawy jest też wynik dotyczący pochodzenia genu MBP jako fuzji dwóch niezależnych genów.

Ocena struktury pracy

Rozprawa doktorska Pana mgr Macieja Golana ma formę wydruku komputerowego i liczy 70 stron. Napisana jest poprawnym językiem polskim. Tekst pracy zilustrowany jest 7 tabelami, 18 rycinami w tym 60-oma fotografiami. Układ pracy jest typowy dla rozpraw doktorskich i zawiera streszczenie, wstęp, cel pracy, dane o materiale i metodyce badań, omówienie wyników, dyskusję, wnioski. Spis piśmiennictwa liczy 183 pozycji, z których 67 obejmuje okres ostatnich 10 lat.

Pracę rozpoczyna czytelny Spis treści. Po wykazie skrótów znajduje się Streszczenie w języku polskim oraz angielskim. We Wstępie, liczącym 11 stron, Doktorant opisał historię badań nad oligodendrocytami oraz podsumował dotychczasową wiedzę dotyczącą ich funkcji. Następnie w przystępny sposób przedstawił budowę mieliny z kluczowymi białkami oraz jej dysfunkcje. We wstępie przedstawił również badania nad ewolucją układu nerwowego, budowę mózgowia oraz badania dotyczące modeli i chorób mózgu. Doktorant umiejętnie cytował piśmiennictwo i krytycznie je dobrał do wiedzy teoretycznej dotyczącej omawianych zagadnień. Nie ustrzegł się jednak nielicznych błędów interpunkcyjnych oraz edytorskich, które pojawiły się w tym rozdziale. Nie umniejszają one wartości pracy:

- zabrakło słowa „należy” w zdaniu „do których, między innymi...” (str. 3),
- w zdaniu „Mutacje te powodują - dysmielinizację,” powinien być myślnik a nie myślnik w indeksie dolnym (str. 4),

- brak kropki w zdaniu „..... oraz zwiększoną podatność na proteolizę. „ (str. 5)

Przedstawione po Wstępie cele zostały jasno sformułowane.

W Materiałach i Metodach, Doktorant opisał materiał badawczy, szczegółowe procedury badawcze, techniki wykorzystane do badań. Podał zgody i ich numery dla odpowiednich komisji etycznych i bioetycznych. Metodyka została trafnie dobrana do postawionych celów. Bardzo przejrzysto opisano jak liczono gęstość komórek. Doktorant podał nazwę użytego testu statystycznego. Znalazłam jednak w tym rozdziale informacje o wykonaniu barwienia immunohistochemicznego w celu wykazania obecności łańcucha ciężkiego ferrytyn (FTH) a wyniki nie opisują takich danych. Doktorant nie opisał jakie psy były donorami mózgów (w jakim wieku, czy znane są rasy tych psów?). W rozdziale III.2.1. zabrakło informacji o medium syntetycznym. Podobnie nie wiadomo jakie było stężenie PBS-u w metodzie na wykrywanie obecności żelaza w oligodendrocytach czy stężenie buforu cytrynianowego zastosowanego do immunodetekcji białka MBP. W metodzie opisującej reakcję immunohistochemiczną znalazło się niewłaściwe sformułowanie: przeciwciała pierwotne i wtórne - raczej powinno być przeciwciała pierwszo- i drugorzędowe.

Wyniki zostały opracowane dość starannie i dokładnie. Liczne fotografie (bardzo dobrej jakości), oraz tabele ułatwiają ich zrozumienie i przeanalizowanie. Opis wyników jest jasny i przystępny. Znalazłam jednak kilka uchybień. Należałoby ujednolicić wielkość czcionki na zdjęciach, a zdjęcia powinny być zdecydowanie większe, co ułatwiłoby ich analizę, a znacznik skali byłby również lepiej widoczny. W tytułach do rycin znacznik skali powinien jako jednostkę mieć mikrometr a nie um. Ponadto, ryciny 5-7 w tytule posiadają informacje o barwieniu na obecność łańcucha ferrytyn a zdjęcia z panelu A w rzeczywistości przedstawiają barwienie na MBP u człowieka. W mojej opinii układ opisu Hip i CC powinien być zamieniony w kontekście kolejności gdyż ryciny prezentujące odpowiednie fragmenty mózgu mają numery w układzie malejącym. Bardzo ciekawe wyniki z analiz filogenetycznych niezwykle wzbogacają pracę, ale podobnie jak w przypadku zdjęć niektóre z rycin powinny być zdecydowanie większe. Dotyczy to ryciny 8, gdzie kladogram jest słabo widoczny czy rycin 11a i 11b.

W Dyskusji Doktorant konfrontuje uzyskane wyniki z danymi literaturowymi, zachowując odpowiedni stopień krytycyzmu. Autor wykazał się bardzo dobrą znajomością problemów związanych z tematyką pracy. Wnioski, podsumowujące uzyskane dane, zostały jasno sformułowane i odpowiadają wyznaczonym celom, choć brakuje mi wniosku dotyczącego gęstości OLG w LF u psa. Bogate piśmiennictwo jest aktualne oraz prawidłowo dobrane i zacytowane. Autor nie ustrzegł się jednak błędów w rozdziale VII (Bibliografia). Należałoby zastosować ten sam wzór opisu pozycji literaturowych dla wszystkich źródeł.

Podsumowując, Autor wykazał umiejętność samodzielnego rozwiązywania problemów badawczych, dobre stosowanie i opanowanie technik badawczych oraz znajomość literatury. Uzyskane przez Doktoranta wyniki stanowią Jego oryginalne osiągnięcie i dostarczają nowych informacji dotyczących oligodendrocytów u psa i człowieka jak również uzupełniają i poszerzają wiedzę ogólną dotyczącą morfologii, dystrybucji oraz zawartości żelaza w oligodendrocytach ośrodkowego układu nerwowego. Autor dokonał również bardzo ciekawej i nowatorskiej analizy bioinformatycznej markerów badanych komórek, w ujęciu ewolucyjnym. Przedstawione wyżej uwagi krytyczne nie umniejszają wartości merytorycznej pracy.

Stwierdzam zatem, że przedstawiona do recenzji praca doktorska Pana mgr macieja Golana pod tytułem „**Analiza histologiczna i bioinformatyczna kluczowych markerów oligodendrocytów w wybranych obszarach mózgu człowieka i psa**” odpowiada warunkom określonym przez ustawę z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce (Dz.U. 2018 poz. 1669 z późn. zm) i wnoszę o dopuszczenie Kandydata do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Dr hab. Bożena Pawlikowska-Pawlęga, prof. UMCS



*dr hab. Bożena Pawlikowska-Pawlęga,
prof. UMCS*