



UMCS

UNIWERSYTET MARII CURIE-SKŁODOWSKIEJ W LUBLINIE

Wydział Biologii i Biotechnologii

Dr hab. Bożena Pawlikowska-Pawłęga, prof. UMCS
Katedra Anatomii Funkcjonalnej i Cytobiologii
Uniwersytet Marii Curie- Skłodowskiej w Lublinie
Ul. Akademicka 19, 20-033 Lublin

Lublin, 27.11.2019

Recenzja

Rozprawy doktorskiej Pani lek. wet. Izabeli Krawczyk - Marć pt.: „Badania rozmieszczenia oligodendrocytów i obecności w nich żelaza w mózgowiu szynszyli małej (*Chinchilla lanigera*)”.

Pani lek. wet. Izabela Krawczyk-Marć wykonała pracę w Katedrze Nauk Morfologicznych, w Zakładzie Histologii i Embriologii, Wydziału Medycznego, Uniwersytetu w Rzeszowie pod kierunkiem Pana prof. dr hab. n. med. Stanisława Orkisz.

Ocena merytoryczna pracy

Przedstawiona do recenzji praca doktorska obejmuje dobrze zaplanowane i wykonane badania laboratoryjne, w których Autorka analizowała rozmieszczenie oraz obecność żelaza w oligodendrocytach szynszyli małej (*Chinchilla lanigera*). Badania przeprowadzono w obszarach słabo i mocno zmielinizowanych mózgowia. Do badań wybrano: korę mózgową, hipokamp, istotę szarą okołowodociągową, ciało modelowate oraz torebkę wewnętrzną. Doświadczenia przeprowadzono pod kątem dystrybucji oligodendrocytów w wybranych obszarach ośrodkowego układu nerwowego, histochemicznej analizy obecności w nich

żelaza, immunodetekcji zasadowego białka mieliny (MBP) oraz analizy wybranych parametrów morfometrycznych komórek. Oligodendrocyty należą do unikalnego typu neurogleju. Są to małe komórki, które zazwyczaj układają się wzdłuż włókien nerwowych, wytwarzając ich osłonki mielinowe w ośrodkowym układzie nerwowym. Na ogół przylegają do neuronów, szczególnie w istocie szarej. Dopiero stosunkowo niedawno zaczęto je badać i szczegółowo poznawać. Niezwykle istotne, w kontekście chorób neurodegeneracyjnych i różnorodnych zaburzeń neurologicznych, jest ich rola w procesie mielinizacji oraz zarządzanie gospodarką żelaza. Wykazano bowiem degenerację lub utratę oligodendrocytów, zaburzenia w poziomie białek budujących osłonkę mielinową czy też zaburzenia homeostazy żelaza w takich chorobach jak m.in.: choroba Alzheimera, stwardnienie rozsiane czy stwardnienie zanikowe boczne. Podjęcie badań było więc bardzo ważne, gdyż do tej pory oligodendrocyty badano głównie u szczura i myszy zaś nieliczne doniesienia dotyczą tej tematyki u ludzi i innych zwierząt nielaboratoryjnych. Szynszyla, obecnie zwierzę hodowlane, fermowe i towarzyszące, znana jest szczególnie z unikalnych cech okrywy włosowej. Brak jest jednak badań, w odniesieniu do tego gatunku, na temat rozmieszczenia oligodendrocytów, ich morfologii oraz dystrybucji żelaza. Dlatego też podjęcie badań uważam za celowe i bardzo uzasadnione.

Doktorantka w swojej pracy wykazała nierównomierne rozmieszczenie oligodendrocytów w korze mózgowej, istocie szarej wodociągowej oraz hipokampie. Badane komórki występowały parami albo jako pojedyncze oligodendrocyty w pobliżu naczyń krwionośnych oraz neuronów. W hipokampie największą ich gęstość obserwowano w polach CA2 i CA3. Odmienne ułożenie, Autorka Dysertacji, odnotowała w obszarach mocno zmielinizowanych tj. torbce wewnętrznej oraz ciele modzelowatym, gdzie oligodendrocyty ułożone były w charakterystyczne rzędy. Co ciekawe, zaobserwowała czterokrotnie większą niż w obszarach słabo zmielinizowanych, gęstość oligodendrocytów w obszarach mocno zmielinizowanych. Równocześnie, zastosowane przez Doktorantkę metody, potwierdziły podobną dystrybucję badanych komórek gleju w wybranych obszarach mózgowia szynszyli małej. Z kolei analiza porównawcza oligodendrocytów u samic i samców szynszyli małej wykazała, że w obszarach słabo i mocno zmielinizowanych mózgowia u samców i samic badane komórki nie wykazywały różnic morfometrycznych. Doktorantka wykazała w swoich badaniach obecność żelazopozytywnych oligodendrocytów, które posiadały, jak czytamy w dyskusji, brązowy produkt reakcji histochemicznej w cytoplazmie i wypustkach (szkoda, że we wnioskach ten aspekt badań tj. dotyczący dystrybucji żelaza nie został ujęty). Jednocześnie tłumaczy i interpretuje uzyskane wyniki wskazując, że „umiejscowienie

żelazopozytywnych oligodendrocytów przy naczyniach krwionośnych, świadczyć może o ich roli w dystrybucji tego pierwiastka w mózgowiu u szynszyli natomiast oligodendrocyty, które zlokalizowane są przy neuronach, mogą być źródłem żelaza niezbędnego dla procesów metabolicznych neuronów’’. W mojej opinii, słuszność postawionych wniosków oraz wzbogacenie pracy o nowe i cenne doniesienia, mogłyby jednoznacznie potwierdzić badania na poziomie mikroskopii elektronowej z wykorzystaniem techniki mikroanalizy rentgenowskiej (EDX) czy spektroskopii strat energii elektronów (EELS). Ocena dystrybucji żelaza na poziomie ultrastrukturalnym skojarzona z wynikami uzyskanymi na poziomie mikroskopii świetlnej umożliwiłaby uzyskanie dokładnej komórkowej i regionalnej dystrybucji żelaza w badanych komórkach i obszarach mózgowia szynszyli malej. Ciekawe było zastosowanie barwienia immunohistochemicznego z użyciem przeciwciał przeciwko zasadowemu białku mieliny. Cenne byłoby jednak, wykonanie dodatkowych testów określających poziom ekspresji tego białka w badanych rejonach ośrodkowego układu nerwowego, na przykład metodą Western Blot, co dostarczyłoby dodatkowych, precyzyjnych informacji, a być może wykazałoby różnice ilościowe nie tylko pomiędzy obszarami badawczymi ale też pomiędzy samcami i samicami.

Należy mieć nadzieję, że Doktorantka podejmie próbę wyjaśnienia i uzupełnienia powyższych problemów badawczych w swojej dalszej pracy naukowej.

Ocena struktury pracy

Rozprawa doktorska lek. weterynarii Izabeli Krawczyk-Marć ma formę wydruku komputerowego i liczy 94 strony. Napisana jest poprawnym językiem polskim. Tekst pracy zilustrowany jest 9 tabelami, 40 fotografiami oraz 7 wykresami. Układ pracy jest typowy dla rozpraw doktorskich i zawiera wstęp, cel pracy, dane o materiale i metodyce badań, omówienie wyników, dyskusję, wnioski. Spis piśmiennictwa liczy 151 pozycji, z których 92 obejmuje okres ostatnich 10 lat.

Pracę rozpoczyna czytelny Spis treści. We Wstępie, liczącym 21 stron, Doktorantka scharakteryzowała oraz podsumowała dotychczasową wiedzę o różnych typach komórek glejowych ośrodkowego układu nerwowego w tym wiedzę dotyczącą astrocytów, mikrogleju, ependymocytów i oligodendrocytów. W przystępny i jasny sposób przedstawiła proces mielinizacji oraz związek oligodendrocytów z gospodarką i homeostazą żelaza. Doktorantka umiejętnie cytowała piśmiennictwo i krytycznie je dobrała do wiedzy teoretycznej dotyczącej omawianych zagadnień. Nie ustrzegła się jednak błędu. Zabrakło mi bowiem informacji, w tym rozdziale pracy, na temat budowy hipokampa, kory mózgowej, istoty szarej okołowodociągowej, ciała modzelowatego oraz torebki wewnętrznej jako badanych struktur

mózgowia. Te informacje znalazły się natomiast w metodyce. Nieliczne błędy interpunkcyjne oraz edytorskie, które pojawiły się w tym rozdziale, nie umniejszają wartości pracy:

- organele zamiast organelle (str.10),
- po 60. dniu jest kropka a nie powinno jej być (str. 16),
- transferyna - zamiast transferyna - należałoby ujednoczyć (str. 20 i 21)
- wewnątrzkomórkowej zamiast wewnątrzkomórkowej (str. 21),
- fosfodiesteraza - zamiast fosfodiesteraza (str. 21)

Przedstawione po Wstępie cele zostały jasno sformułowane.

W Materiałach i Metodach, Doktorantka opisała materiał badawczy, szczegółowe procedury badawcze, techniki wykorzystane do badań oraz, co moim zdaniem jest niefortunne, obszary mózgowia, w których badano oligodendrocyty (te informacje powinny być zamieszczone we wstępie). Metodyka została trafnie dobrana do postawionych celów. Nie znalazłam jednak, w tym rozdziale, odniesień do literatury w przypadku wszystkich metod. Doktorantka nie opisała w jaki sposób były uśmiercane zwierzęta. Moją wątpliwość budzi też grubość skrawków uzyskiwana na mikrotomie rotacyjnym tj. 20 μm , zwłaszcza, że zdjęcia uzyskane przez Dysertantkę są bardzo dobrej jakości. Brakuje również informacji dotyczących ilości skrawków, ilości komórek nerwowych oraz liczby powtórzeń analizowanych preparatów. Nie jest jasne jak liczono gęstość komórek. Doktorantka nie podała nazwy użytego testu statystycznego. W metodach znalazłam braki dotyczące czasów utrwalania, płukania czy inkubacji a w metodzie opisującej reakcję immunohistochemiczną znalazło się niewłaściwe sformułowanie: przeciwciało pierwotne i wtórne - raczej powinno być przeciwciało pierwszo- i drugorzędowe.

Wyniki zostały opracowane starannie i dokładnie. Liczne fotografie (bardzo dobrej jakości), tabele oraz wykresy ułatwiają ich zrozumienie i przeanalizowanie. Opis wyników jest jasny i przystępny. Znalazłam kilka drobnych uchybień. Należałoby ujednoczyć wielkość czcionki na zdjęciach, dodać tytuły osi Y wraz z jednostkami i ich dokładnościami oraz uzupełnić wykresy o wartości odchylenia standardowego.

W Dyskusji Doktorantka konfrontuje uzyskane wyniki z danymi literaturowymi, zachowując odpowiedni stopień krytycyzmu. Autorka wykazała 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 dystrybucji żelaza w badanych komórkach w różnych rejonach mózgowia szynszyli małej. Pracę kończy Streszczenie w języku polskim oraz angielskim. Bogate piśmiennictwo jest aktualne oraz prawidłowo dobrane i zacytowane.

Podsumowując, Autorka wykazała umiejętność samodzielnego rozwiązywania problemów badawczych, dobre stosowanie i opanowanie technik badawczych oraz znajomość literatury. Uzyskane przez Doktorantkę wyniki stanowią Jej oryginalne osiągnięcie i dostarczają nowych informacji dotyczących oligodendrocytów u szynszyli małej jak również uzupełniają i poszerzają wiedzę ogólną dotyczącą morfologii, dystrybucji oraz zawartości żelaza w oligodendrocytach ośrodkowego układu nerwowego. Przedstawione uwagi krytyczne nie umniejszają wartości merytorycznej pracy.

Stwierdzam zatem, że przedstawiona do recenzji praca doktorska Pani Izabeli Krawczyk-Marć pod tytułem „**Badania rozmieszczenia oligodendrocytów i obecności w nich żelaza w mózgowiu szynszyli małej (*Chinchilla lanigera*)**” odpowiada warunkom określonym w art. 13 ustawy z dnia 14 marca 2013 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 64, poz. 595, ze zm.) i wnoszę o dopuszczenie Kandydatki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Bożena Pawlikowska-Pawłęga

Dr hab. Bożena Pawlikowska-Pawłęga, prof. UMCS