

Warszawa, 7 stycznia 2025

Recenzja pracy doktorskiej mgr Karoliny Przepiórskiej-Drońskiej
Zatytułowanej „Identyfikacja molekularnych mechanizmów działania amorfutyny B w komórkowych modelach uszkodzeń mózgu: badania z wykorzystaniem pierwotnych hodowli mysich neuronów i ludzkiej linii mikrogleju”

Rozprawa doktorska przedstawiona do recenzji została wykonana w Instytucie Farmakologii im. Jerzego Maja pod kierunkiem prof. dr hab. Małgorzaty Kajty jako promotora i dr hab. Agnieszki Wnuk jako promotora pomocniczego.

Tematem rozprawy jest działanie protekcyjne amorfutyny B w modelach niedotlenienia mózgu *in vitro*, w szczególności mechanizmy molekularne zaangażowane w ochronę komórek przez amorfutynę B po zadziałaniu hipoksji lub ischemii. Zagadnienie to zasługuje na badanie ze względu na potrzeby kliniczne. Udar mózgu i niedotlenienie okołoporodowe są jednymi z głównych powodów niepełnosprawności i śmierci pacjentów, częstość ich występowania rośnie, a obecnie dostępne metody leczenia są niewystarczające. Rozwój nowych terapii w zakresie udarów mózgu i niedotlenienia mózgu jest więc niezbędny. Stąd konieczność poszukiwania innowacyjnych podejść terapeutycznych i nowych substancji, które mogłyby skuteczniej przeciwdziałać konsekwencjom udarów i asfiksji. Potencjał neuroprotekcyjny aktywacji receptora PPAR γ , celu molekularnego amorfutyny B, był wcześniej wykazany, co uzasadniało podjęcie badań nad tą substancją. Można było oczekiwać, że wyniki będą miały wysoki potencjał translacyjny ze względu na schemat doświadczenia, w którym podawano amorfutynę B po upływie sześciu godzin od niedotlenienia.

Rozprawa ma nietypowy układ. Jeśli chodzi o przedstawione wyniki, to składają się na nie dane opublikowane w dwóch publikacjach, w których doktorantka jest pierwszą autorką oraz część danych z trzeciej publikacji. Doktorantka dostosowała formę rozprawy, omawiając poszczególne publikacje w dużej mierze oddzielnie. Część pracy Wnuk i wsp. 2021, która weszła do niniejszej rozprawy, a nie do osiągnięcia habilitacyjnego dr hab. Wnuk, jest szczegółowo opisana w tekście rozprawy. Publikacje Przepiórska i wsp. 2023 oraz Przepiórska-Drońska i wsp. 2024 dołączone są do rozprawy i krótko podsumowane w tekście.

Na tekst rozprawy składają się następujące rozdziały: Spis treści, Wykaz najczęściej używanych skrótów, Wstęp (17 stron), Hipoteza badawcza, Cel badań, Przebieg doświadczeń, Badania stanowiące opisową część rozprawy doktorskiej (19 stron), Publikacja 1 (5 stron), Publikacja 2 (5 stron), Dyskusja (13 stron), Podsumowanie (10 stron), Wnioski, Wnioski końcowe, Streszczenie, Summary i Bibliografia. W spisie treści nie są wymienione dołączone oświadczenia współpracowników o ich wkładzie w publikacje i o zgodzie na użycie wyników do niniejszej rozprawy oraz odbitki publikacji Przepiórska i wsp. 2023 oraz Przepiórska-Drońska i wsp. 2024.

Generalnie, edytorsko praca jest wykonana starannie. Oczywiście Doktorantka nie ustrzegła się błędów, na przykład: nienadanie numeru i brak opisu ryciny zamieszczonej na stronie 23; nadanie tych samych numerów czterem rycinom (Rys. 1 do 4 vs. Ryc. 1 do 4); niewystarczające (Rycina 2 na stronie 15) lub nieadekwatne (np. Rycina 4 na stronie 20) opisy rycin; opisy rycin nie zawierające tytułu ryciny (Rycina 1 na stronie 34, Rycina 2 na stronie 36; Rycina 5 na stronie 42); niepoprawne lub niezręczne sformułowania („referuje się słowem ‘ischemia’”; centralny układ nerwowy; tkanka mózgowa; efekty są w zgodzie; czynnik *BCL2/BCL2*; poziom parametru Fluoro-Jade C, neurony warstwy korowej); nieponumerowane tabele. Czytanie pracy znacząco utrudnia niestosowanie

przez Doktorantkę podziałów testu na akapity, które znalazłam tylko dwa (str. 14, 17), w tym żadnego w rozdziale Dyskusja.

Wstęp zawiera podstawowe informacje dotyczące patofizjologii udaru niedokrwienego mózgu i niedotlenienia okołoporodowego mózgu oraz odpowiedzi komórek na niedobór tlenu i/lub glukozy. Szczegółowo omówione są mechanizmy apoptozy, autofagii, reakcji zapalnej, stresu oksydacyjnego i zmiany epigenetyczne w kontekście chorób neurologicznych. Następnie Doktorantka przytacza przykłady badań klinicznych cząsteczek działających na niektóre wymienione procesy. W tym miejscu tekstu brakuje odniesień do informacji o próbach klinicznych oraz literatury dotyczącej właściwości niektórych wspomnianych substancji. W ramach uzupełnienia treści napomknę tu, że badanie kliniczne III fazy cząsteczki 3K3A-APC zostało wstrzymane przez NIH w 2023 z powodu wykrytych nieprawidłowości. Następnie Doktorantka opisuje szczegółowo mechanizm działania neuroprotektynowego PPAR γ . Wstęp kończy podrozdział opisujący działanie amorfrutyny B na PPAR γ i związany z tym potencjał neuroprotektynowy tej cząsteczki. Wstęp ilustrują ładne rysunki podsumowujące najważniejsze przedstawione w tekście informacje. Stanowi on wystarczające wprowadzenie w tematykę badań.

Hipoteza badawcza została sformułowana w trzech punktach mówiących, że (i) amorfrutyna B ma działanie protekcyjne na komórki poddane hipoksji lub ischemii poprzez działanie przez receptor PPAR γ oraz hamowanie stresu oksydacyjnego i zmiany epigenetyczne; (ii) działanie neuroprotektynowe amorfrutyny B polega na hamowaniu apoptozy, autofagii i zmianach w poziomach miRNA; (iii) Amorfrutyna B hamuje wywołaną hipoksją lub ischemią aktywację mikrogleju hamując reakcję zapalną i potencjał proliferacyjny oraz stabilizując aktywność metaboliczną komórek. Zaplanowane w celu falsyfikacji tej hipotezy badania miały cztery cele (i) opracowanie modeli niedotlenienia i niedokrwienia mózgu *in vitro*; (ii) zbadanie właściwości neuroprotektynowych i wpływu na ścieżkę PPAR γ w neuronach poddanych hipoksji lub ischemii; (iii) zbadanie wpływu podania amorfrutyny B na stres oksydacyjny, apoptozę, autofagię i parametry epigenetyczne w w neuronach poddanych hipoksji lub ischemii; (iv) zbadanie wpływu amorfrutyny B na aktywację mikrogleju wywołaną hipoksją lub ischemią. Schematy planowanych doświadczeń zostały czytelnie przedstawione na rysunku (str. 23) Moją wątpliwość budzi cel pierwszy, czyli opracowanie modeli niedotlenienia i niedokrwienia mózgu *in vitro*. Modele niedotlenienia oraz deprywacji tlenu i glukozy *in vitro* są stosowane od dawna i powszechnie, również w laboratorium prof. Kajty. Jaki był wkład niniejszej rozprawy w opracowanie tych modeli w porównaniu z wcześniej stosowanymi?

Kolejną częścią jest opis badań z publikacji Wnuk i wsp. 2021, które weszły w skład niniejszej rozprawy. Doktorantka rozpoczyna opisem metodyki. Opis jest zasadniczo wystarczający do powtórzenia doświadczeń, zauważyłam jednak niedociągnięcia: brak numerów katalogowych przeciwciał i zestawów, brak sprecyzowania gatunku pochodzenia surowicy zwierzęcej (str. 29), użycie terminu poziom, zamiast aktywność enzymów. W opisie metodyki pominięto zupełnie metody użyte do analizy barwień immunocytochemicznych. Nie wspomniano jak definiowano ROI (Region of Interest), jak normalizowano tło ani jak obliczano długość dendrytów.

Kolejny podrozdział, Uzasadnienie badań powtarza część informacji wspomnianych uprzednio. Nie zawiera żadnych referencji do literatury.

Opis wyników włączonych do opisowej części rozprawy rozpoczyna się od nadmienia wpływu amorfrutyny na neurodegenerację w testach Fluoro-Jade C oraz MTT. Nie jest jasne, czy miała to być część prezentacji wyników, ponieważ nie ma podanych danych liczbowych. Nie opisano również metodyki wykorzystanej do tych badań. Następnie zaprezentowane są dane wskazujące na zmniejszanie przez amorfrutynę stresu oksydacyjnego i uszkodzeń DNA wywołanych hipoksją lub ischemią. Do wywołania tych efektów amorfrutyny B niezbędna była niezaburzona ekspresja receptora PPAR γ . Amorfrutyna B wpływała też na aktywność HAT i sirtuin. Doktorantka stwierdza,

że wykorzystując barwienie MAP2 zaobserwowała zahamowanie wzrostu dendrytów. Nie podaje jednak żadnych wartości liczbowych. Na Rycinie 4 efekt ten nie jest oczywisty ze względu na różnice w gęstości komórek na poszczególnych panelach. Zainteresowała mnie natomiast obecność elementów zawierających PPARy ale nie MAP2. Czy doktorantka próbowała je scharakteryzować? Trudno mi się odnieść do wartości liczbowych poziomów PPARy, ponieważ nie jest jasne jak zostały otrzymane. W podsumowaniu do tej części wyników Doktorantka stwierdza, że podanie amorfrutyny B powodowało zmniejszenie stopnia uszkodzenia neuronów. Nie zostało to jednak skwantyfikowane. Doktorantka stwierdza też, że amorfrutyna B normalizuje status epigenetyczny neuronów. Czy nie jest to zbyt daleko idący wniosek i czy aktywność enzymów jest jedynym i kluczowym poziomem regulacji epigenetycznej?

Kolejną częścią rozprawy jest opisanie wyników znajdujących się w załączonych do rozprawy publikacjach Przepiórska i wsp. 2023 oraz Przepiórska-Drońska i wsp. 2024. W Publikacji 1 wykazano, że podanie amorfrutyny B zmniejsza apoptozę neuronów wywołaną niedotlenieniem lub ischemią, obniża ekspresję proapoptycznych genów i białek oraz zwiększa ekspresję antyapoptycznego BCL2. Zaobserwowano zmiany metylacji w genie Bax. Stwierdzono również w działaniu neuroprotekcynym amorfrutyny B rolę wpływu na autofagię. Ponadto amorfrutyna B wpływała na poziomy ekspresji miRNA związanych z apoptozą i autofagią. W Publikacji 2 Autorzy badali wpływ amorfrutyny B na efekty niedotlenienia i ischemii w komórkach mikrogleju *in vitro*. Wykazali, że amorfrutyna B przeciwdziała stanom zapalnym i wpływa na stan mitochondriów i potencjał proliferacyjny w sposób zależny od PPARy. Ponadto amorfrutyna B normalizowała wywołany niedotlenieniem lub ischemią efekt na potencjał błony mitochondrialnej, ekspresję mRNA BCL2 i poziom białka BCL2 oraz aktywność metaboliczną.

Załączone, opublikowane już prace przeszły proces recenzencki, dlatego nie będę ich szczegółowo recenzować. Dodatkowo, na formę publikacji wpływają zarówno współautorzy, jak i wytyczne czasopisma. W związku z tym, pewne niedociągnięcia, które w klasycznej rozprawie budziłyby zastrzeżenia (np. brak numerów katalogowych przeciwna, niewystarczające opisanie metod) nie mogą tu być oceniane.

Publikacje omówione są oddzielnie w dwóch rozdziałach o tej samej strukturze, zawierających takie same podrozdziały: Posumowanie wykorzystanych metod badawczych oraz badanych parametrów i procesów (tabela), Uzasadnienie badań i Wyniki badań zakończone paragrafem Podsumowanie badań. Wyniki przedstawione są skrótowo, bez odniesienia do rycin w publikacjach, co ułatwiłoby czytanie tekstu. Dyskusja poprowadzona jest ponownie oddzielnie dla wyników uzyskanych z użyciem hodowli neuronalnych i hodowli mikrogleju. Podsumowanie napisane jest oddzielnie dla wyników znajdujących się w opisowej części rozprawy, Publikacji 1 i Publikacji 2. Powtarza ono informacje z poprzednich rozdziałów, tyle, że w innej formie. W mojej opinii jest to rozdział niepotrzebny i wszystkie te treści powinny się znaleźć w Wynikach lub Dyskusji. Następnie pojawiają się Wnioski oraz Wnioski końcowe. Nie widzę uzasadnienia dla formułowania dwóch grup wniosków. Zgodnie z wymaganiami Ustawy, praca zawiera streszczenia w języku polskim i angielskim. Licząca 222 pozycje bibliografia jest bogata i prawidłowo cytowana.

Podczas czytania części dysertacji opisującej opublikowane prace nasunęły mi się pytania o których wyjaśnienie poproszę podczas obrony. Co to jest „otoczka wypukła komórki” oraz czy Doktorantka sama przeprowadziła badania morfometryczne mikrogleju. Co oznacza stwierdzenie o obniżeniu błonowego potencjału mitochondrialnego w płynie mózgowo-rdzeniowym pacjentów po udarze krwotocznym. Dlaczego Doktorantka interpretuje wywołany amorfrutyną B wzrost poziomu LDH jako artefakt obecności FBS w pożywce? Czy stężenie FBS było inne dołkach zawierających amorfrutynę B? Czy możliwe jest inne wytłumaczenie tego zjawiska? Doktorantka stwierdza, że normalizacja poziomów miRNA stanowi mechanizm działania amorfrutyny B (str. 64). Czy możliwe

jest, że jest to skutek działania neuroprotekcynnego amorfrutyny B? Że inne zmiany wywołane podaniem amorfrutyny B obserwowane w badaniach przez Doktorantkę są skutkiem neuroprotekcji? Odwołując się do Ryciny 5 zapytam, czy któryś z wymienionych mechanizmów jest nadrzędny jako włącznik neurodegeneracji regulowany przez amorfrutynę B, a niektóre zmiany są efektem wywołanej przez nią neuroprotekcji?

Poproszę też o kilka wyjaśnień dotyczących Publikacji. W Publikacji 1 w rozdziale Results stwierdzono, że podanie amorfrutyny B zmniejszyło przemodelowanie chromatyny, co zrozumiałam jako zmniejszenie liczby ognisk heterochromatyny związanych z apoptozą, jednak nie podano danych liczbowych. Czy i jak zostało to policzone? Dlaczego Doktorantka zdecydowała się przedstawić dane o poziomach miRNA w postaci nieprzyjaznych dla czytelnika macierzy? Czy biorąc pod uwagę format danych można było je scalić w tabele? W Publikacji 2, pierwszy rozdział wyników zatytułowany jest „Amorfrutin B Inhibited the Activation of Microglia Through Decrease in IBA1 Expression”. Czy możliwe jest, że IBA1 jest jedynie markerem aktywacji mikrogleju i nie jest zaangażowany w mechanizm działania amorfrutyny B?

Powyższe uwagi nie obniżają wartości pracy przedstawionej do oceny. Wysoko oceniam jakość i zakres uzyskanych przez mgr Karolinę Przepiórską-Drońską wyników. Dużą wartość jej pracy polega na zgromadzeniu całościowych danych o wpływie substancji o potencjalnym znaczeniu klinicznym w leczeniu udarów i asfiksji na dwie populacje komórek mózgu. Mgr Przepiórka-Drońska udowodniła neuroprotekcynny potencjał amorfrutyny B i zaproponowała mechanizmy jej działania. Jej wyniki bez wątpienia będą podstawą planowania dalszych badań.

Rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (t.j. Dz.U. 2023, poz. 742 z późn. zm.). W związku z tym, wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Instytut Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk o dopuszczenie mgr. Karoliny Przepiórskiej-Drońskiej do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu, dyscyplinie nauki medyczne.

Prof. dr hab. Katarzyna Łukasiuk

Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego, PAN

Ul. Pastura 3, 02-093 Warszawa

Email: k.lukasiuk@nencki.edu.pl

Tel: 505 165 467