

Zakład Neurotoksykologii
Prof. dr hab. Magdalena Zielińska
Kierownik
tel.: 48 22 608 64 70
e-mail: mzielinska@imdik.pan.pl

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

mgr Karoliny Przepiórskiej-Drońskiej

pt. *„Identyfikacja molekularnych mechanizmów działania amorfrutyny B w komórkowych modelach hipoksyjno-ischemicznych uszkodzeń mózgu: badania z wykorzystaniem pierwotnych hodowli mysich neuronów i ludzkiej linii mikrogleju”*

wykonanej w Instytucie Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk
pod kierunkiem prof. dr hab. Małgorzaty Kajty - promotora rozprawy
i dr hab. Agnieszki Wnuk - promotora pomocniczego rozprawy

Tematyka rozprawy doktorskiej mgr Karoliny Przepiórskiej-Drońskiej wpisuje się w nurty badawcze rozwijane w Pracowni Neurofarmakologii i Epigenetyki Instytutu Farmakologii PAN, i stanowi jednocześnie oś naukowych zainteresowań Promoterek rozprawy. Już na wstępie Kandydatka przytacza aktualne dane epidemiologiczne, uzasadniające od strony klinicznej wagę problemu, którego dotyczy przedłożona rozprawa doktorska. Przytoczone dane liczbowe: ponad 12 milionów osób na całym świecie co roku doświadczają udaru mózgu, z czego ponad 6,5 miliona pozostaje w pewnym stopniu niepełnosprawności lub umiera - istotnie wywołują zamierzony efekt mrozący. Drugim ramieniem badań, których realizacji podjęła się Kandydatka jest stan niedotlenienia okołoporodowego, co stanowi trzecią przyczynę zgonów noworodków na świecie. Kandydatka odwołując się do globalnego zasięgu obu schorzeń sięga po kluczowy argument całkowicie uzasadniający podjęcie tematu; dlatego też wybór zagadnień rozprawy, wobec przytoczonych faktów, należy uznać za aktualny i ważny poznawczo. Zawężeniem tematyki w kontekście omawianych stanów neurologicznych jest próba identyfikacji mechanizmów neuroprotekcji działania selektywnego liganda receptora aktywowanego przez proliferatory peroksysomów typu gamma (PPAG γ), amorfrutyny B, związku o relatywnie bezpiecznym profilu działania farmakologicznego. Zdefiniowanie tego problemu przez Kandydatkę stanowi o oryginalności podjętej tematyki.

Wyniki badań będących podstawą pracy doktorskiej mgr Karoliny Przepiórskiej-Drońskiej zostały sfinansowane ze środków Narodowego Centrum Nauki w ramach realizacji projektu nr 2018/31/B/NZ7/01815 pozyskanego przez Panią Promotor w konkursie OPUS 16.

CHARAKTERYSTYKA OGÓLNA I FORMALNA ROZPRAWY

Przedłożona do oceny rozprawa doktorska jest pracą hybrydową. Rozprawa łączy elementy charakterystyczne dla rozpraw składanych w formie tradycyjnej monografii, z dwiema pracami tworzącymi spójny tematycznie zbiór publikacji, w których Kandydatka pełni wiodącą rolę pierwszego autora. Doktorantka precyzyjnie opisuje, które z wyników badań zawartych w publikacji autorstwa Wnuk, Przepiórska i wsp., opublikowanej w 2021 w czasopiśmie Biomedicines (doi:10.3390/biomedicines9080854) stanowią część opisową pracy. Wyniki zawarte w artykułach naukowych Przepiórska i wsp., Mol. Neurobiol., 2023 (doi:10.1007/s12035-022-03087-9) Przepiórska-Drońska i wsp., J. Neuroimmune Pharmacol.,

2024 (doi: 10.1007/s11481-024-10135-9) składają się na wspomniany zbiór publikacji. Warto dodać, że dokładny zakres badań przeprowadzonych przez Doktorantkę, z odniesieniem do konkretnych rycin, które prezentują wyniki będące jej autorstwa, niezwykle ułatwia i doprecyzowuje indywidualny wkład pracy Kandydatki.

Poszczególne, główne części rozprawy obejmują wstęp, stawiane hipotezy badawcze i cele badań, schematy graficzne przebiegu doświadczeń, metodykę (opisaną oddzielnie dla każdej z części rozprawy, bardziej szczegółowa do części nazwanej roboczo opisową, i w skróconej wersji tabelarycznej dla części tworzącej zbiór artykułów), uzasadnienia podjęcia badań (przedstawione oddzielnie dla każdej z części dysertacji), wyniki badań z podsumowaniem, dyskusję, wnioski, wnioski końcowe, dodatkowo: spis treści, informacja o źródle finansowania badań, wykaz stosowanych skrótów, streszczenie w języku polskim i angielskim, bibliografia oraz kopie publikacji, w których zostały opublikowane wyniki, wraz z odpowiednimi oświadczeniami współautorów. Dokumentacja jest kompletna i spełnia zalecenia Komisji Rady ds. Prowadzenia Czynności e Sprawie Nadania Stopnia Doktora Instytutu Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk dotyczące konstrukcji rozprawy doktorskiej.

Tytuł rozprawy odzwierciedla jej treść. Wszystkie części pracy zostały poprawnie przygotowane, z dużą starannością i inwencją Autorki. Sposób przedstawienia całości pracy sprawia wrażenie dużej troski o właściwe i adekwatne przedstawienie czytającemu znaczenia, wagi i wymowy przeprowadzonych badań, co istotnie ułatwia zarówno śledzenie kolejnych kroków, jak i zrozumienie znaczenia wykonanych badań. Podjęty trud należy docenić, gdyż praca jest przystępna w odbiorze. Piśmiennictwo, liczące 222 pozycji, zostało właściwie dobrane, z uwzględnieniem aktualnych pozycji literaturowych.

Podział treści pomiędzy poszczególne rozdziały jest równomierny i całościowo prezentuje ogólną wiedzę teoretyczną Kandydatki wymaganą od osób ubiegających się o nadanie stopnia doktora w dyscyplinie nauki medyczne. Wstęp, liczący 19 stron zawiera niezbędne informacje wprowadzające i charakteryzujące m.in. warunki wystąpienia epizodu udaru niedokrwiennego, asfiksji okołoporodowej oraz w skrótovej formie omówienie istoty patomechanizmu uszkodzeń mózgu. Większą uwagę Kandydatka obdarzyła molekularny obiekt własnych zainteresowań – receptor PARP γ i amorfutynę B.

Tekst wstępu został wzbogacony oryginalnymi ilustracjami, co z pewnością miało na celu ułatwienie przekazu i przyswojenie informacji. W tym miejscu zwracam uwagę na niepełny podpis pod Rys. 2, gdzie zabrakło wyjaśnienia istoty podziału ryciny na trzy części A, B i C, jak również na brak uzasadnienia merytorycznego zamieszczenia dwóch, w zasadzie tożsamyh rycin (Rys. 2 i Rys. 3). Oczywiście czytający skupia uwagę na niewątpliwej estetyce rycin, jednak poszukiwanie istoty nowości przekierowuje uwagę na poza-merytoryczne obszary w poszukiwaniu znaczenia tego zabiegu. W mojej ocenie również nie do końca zrozumiałą wydaje się opis Rys. 3 w tekście (str. 18 linie 5-7; cyt.: *”SPPAR γ M mogą współdzielić kofaktory wraz z agonistami lub antagonistami, co skutkuje zbieżnymi odpowiedziami biologicznymi w danej tkance.”*); o ile „współdzielenie kofaktorów” przez SPPAR γ M jest zrozumiałe, to „zbieżna odpowiedź biologiczna” jako efekt działania agonisty i antagonisty w danej tkance, nie do końca, dlatego zasadne byłoby doprecyzowanie.

W tym miejscu przedstawiam kolejny komentarz i pytanie jednocześnie, które nasunęło mi się w trakcie czytania. W kontekście tematu rozprawy Kandydatka wymienia i odnosi się do działania przykładowych związków będących ligandami badanego receptora PPAR γ . Doktorantka zwraca uwagę na zależność między strukturą chemiczną liganda, jego wiązaniem

do receptora, indukcją określonych zmian konformacyjnych, następczego i/lub równoczesnego wiązania kofaktorów, pełną, lub częściową odpowiedź transkrypcyjną, a efektami biologicznymi. Nasuwające się pytanie: co wiadomo, na podstawie struktury znanych ligandów i następczym ich sposobie wiązania do receptora, o zmianach konformacyjnych receptora w odniesieniu do amorfrutyny B? Czy znane są szczegóły, mechanizm wiązania, typ (?) zmiany konformacyjnej? Czy można na tej podstawie przewidzieć rodzaj i/lub siłę odpowiedzi biologicznej?

Metodyka w każdej z podsekcji zawiera informacje, które w teorii umożliwiają weryfikację poprawności zastosowanych technik, i jednocześnie ewentualne powtórzenie poszczególnych doświadczeń. W tej części rozprawy Doktorantka opisała wykorzystane modele badawcze: model hipoksji/ischemii wykonany na 7D kulturze komórek neuronów myszy w układzie 6 godzin/18 godzin, imitujący warunki reoksygenacji/reperfuzji *in vivo*, oraz warunki hodowli komórek ludzkiej linii mikrogleju HMC3 w układzie 2-6 godzin/5 lub 18 godzin, i również adekwatnie warunki przeprowadzanych eksperymentów, stosowane techniki i procedury badawcze.

Do tej sekcji mam pytanie o specyficzność użytych siRNA. Czy oligonukleotydy były zaprojektowane, komplementarność zweryfikowana; jak walidowano użyte stężenie siRNA? Jaka była wydajność transfekcji? Biorąc pod uwagę wskazane we wstępie K_i dla amorfutyny wynoszące $0,02 \mu\text{M}$, jaką przesłanką kierowała się Doktorantka stosując stężenie 1 i $5 \mu\text{M}$?

Sekcję prezentującą wyniki podzielono odpowiednio na części odnoszące się do postawionych hipotez; każda z części zakończona została ich podsumowaniem.

OCENA MERYTORYCZNA ROZPRAWY

Przedłożona do recenzji rozprawa miała na celu zweryfikowanie trzech hipotez badawczych:

- 1) Amorfrutyna B chroni komórki nerwowe myszy przed uszkodzeniem wywołanym hipoksją oraz ischemią poprzez zahamowanie stresu oksydacyjnego i zmianę statusu epigenetycznego neuronów, przy udziale ścieżki sygnałowej angażującej receptor $\text{PPAR}\gamma$.
- 2) Mechanizm neuroprotekcijnego działania amorfrutyny B obejmuje hamowanie apoptozy i autofagii oraz regulację profilu ekspresji szeregu miRNA.
- 3) Amorfrutyna B hamuje wywołaną hipoksją oraz ischemią aktywację komórek ludzkiego mikrogleju, głównie poprzez wyciszenie procesów zapalnych, hamowanie potencjału proliferacyjnego i ustabilizowanie aktywności metabolicznej komórek.

Weryfikacji hipotez Kandydatka dokonała poprzez realizację celów badawczych, które zawarła w czterech punktach, a sprowadzające się do **i)** wykazania neuroprotekcyjnych właściwości amorfutyny B uwzględniając szlak angażujący receptor $\text{PARP}\gamma$, **ii)** wykazania molekularnego podłoża właściwości neuroprotekcyjnych amorfutyny B w komórkowych modelach imitujących warunki niedotlenienia i niedokrwienia mózgu. W tym miejscu mam komentarz i zaznaczę, że *opracowanie komórkowych modeli niedotlenienia i niedokrwienia mózgu*, co stanowiło wyznaczony przez Kandydatkę Cel 1, nie jest w mojej ocenie celem badawczym *sensu stricto*; nie znalazłam informacji wskazujących na unikalność opracowanych modeli *in vitro*. Istotnie, weryfikacja użyteczności zastosowanych modeli do dalszych badań z użyciem amorfrutyny B z

dostępną literaturą jest zabiegiem absolutnie przemyślanym i racjonalnym, jednak pozostaje pytanie czy tak sformułowany cel stanowi o oryginalności uzyskanych wyników.

Szczegółowy opis wyników wraz z lekturą załączonych publikacji potwierdza, że Doktorantka dokonała weryfikacji postawionych hipotez i zrealizowała zamierzone cele badawcze, wykazując umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej.

Uzyskane przez Doktorantkę najważniejsze osiągnięcia zamieszczone w dysertacji:

1. Zweryfikowanie neuroprotekcynnego działania amorfutyny B działającej poprzez receptor PPAR γ wobec neuronów korowych w modelu hipoksji/ischemii *in vitro*, oraz identyfikacja molekularnych mechanizmów procesu (Wnuk, Przepiórska i wsp., 2021).
2. Wykazanie, że jednym z elementów oddziaływania amorfutyny B jest interakcja na poziomie epigenetycznym, m.in. jej wpływ na profil miRNA (Przepiórska-Drońska i wsp., 2023).
3. Wykazanie, że amorfutyna B hamuje proces aktywacji linii komórek mikrogleju HMC3 zmieniając fenotyp komórek na przeciwzapalny M2, poprzez hamowanie potencjału metabolicznego i proliferacyjnego komórek (Przepiórska-Drońska i wsp., 2024).

Wyniki odnoszą się do postawionych hipotez i w adekwatny sposób dowodzą zrealizowania wyznaczonych w dysertacji celów badawczych. Podkreślę raz jeszcze, wyniki zostały opublikowane jako prace oryginalne w czasopismach indeksowanych, o międzynarodowym zasięgu: Wnuk, Przepiórska i wsp., *Biomedicines* (2023), Przepiórska i wsp., (2023) *Mol Neurobiol.* oraz Przepiórska i wsp., (2022) *J Neuroimmune Pharmacol.* W dwóch ostatnich wymienionych pracach Doktorantka jest pierwszym autorem; w pierwszej pracy jest autorem równorzędnym.

W dyskusji Doktorantka odnosi wyniki swoich badań do wiedzy literaturowej, w tym zarówno wcześniejszych badań rodzimego zespołu, jak i prac badawczych innych grup badawczych, w większości jak najbardziej aktualnych. Sekcja ta jest w zasadzie pozbawiona niedociągnięć, być może poza nielicznymi uproszczeniami przekazywanych informacji i interpretacji. Bibliografia tej sekcji jest obszerna, co sugeruje, że Doktorantka swobodnie porusza się w swojej tematyce badawczej i śledzi najnowsze doniesienia literaturowe. Niezwykle pomocna dla całościowego oglądu znaczenia poszczególnych wyników pracy, jest rycina przedstawiająca schematyczne podsumowanie zarówno udziału poszczególnych mechanizmów komórkowych i molekularnych zaangażowanych w proces neuroprotekcji, obejmujący szereg różnych analizowanych procesów, jak również modulację/korekcję stanu zapalnego. Reasumując, sposób przedstawienia informacji w tej sekcji dalece ułatwia potraktowanie wyników konkluzywnie, co świadczy ponownie o dojrzałości spojrzenia i dużej dbałości Kandydatki o właściwe przedstawienie znaczenia oryginalności własnych wyników.

Napotkane w Dyskusji kwestie dyskusyjne:

-nieprecyzyjnie dobrana literatura do fragmentu:

cyt. *”Formowanie skupisk heterochromatyny jest markerem początkowego stadium apoptozy, a obniżenie błonowego potencjału mitochondrialnego w płynie mózgowo-rdzeniowym pacjentów po udarze krwotocznym wiąże się z gorszymi rokowaniami powrotu do zdrowia.”* Pierwsza praca dotyczy komórek czerniaka, więc trudno traktować ją jako właściwą referencję do powyższego twierdzenia.

-dyskusja pozornej dyskrepancji między uzyskanymi wynikami, a danymi literaturowymi:

cyt. str. 60: *"Nasz odmienny wynik w modelu ischemii może być efektem zaburzonej homeostazy energetycznej i zmniejszonej tolerancji neuronów na przywrócenie wyjściowego poziomu glukozy (Lu i wsp., 2012; Ahn i Lim, 2019). Nieoczekiwanym efektem była również cytoplazmatyczna lokalizacja receptora PPAR γ w odpowiedzi na uszkodzenie komórek nerwowych i działanie amorfrutyny B, co przypuszczalnie można tłumaczyć dynamicznym transferem jądrowo-cytoplazmatycznym receptora PPAR γ w związku ze wzrostem wewnątrzkomórkowego stężenia jonów wapnia w wyniku hipoksji i ischemii (Umemoto i Fujiki, 2012)"*.

Wydaje się, że pomocna w interpretacji byłaby ocena korelacji między cytoplazmatyczną, a jądrową lokalizacją PPAR γ w komórce. Dodatkowo, całkowicie nowym kierunkiem badań, z oczywistych względów wykraczającym poza cele naukowe rozprawy, mogłoby być porównanie poziomu ekspresji receptora w siateczce endoplazmatycznej i określenie statusu tego organellum. Zarówno ilość jak i sub-komórkowa lokalizacja PPAR γ może być traktowana jako biomarker diagnostyczny. Przykładowo, w pracy Shao i wsp., 2020 (<https://doi.org/10.1186/s12967-020-02271-6>) wykazano, że cytoplazmatyczna lokalizacja PPAR γ jest niezależnym prognostykiem i markerem złego rokowania pacjentek z rakiem piersi. Uogólniając: jądrowa lokalizacja PPAR γ może być związana z pełnioną rolą ochronną, natomiast cytoplazmatyczna lokalizacja PPAR γ mogłaby definiować stopień rozwoju uszkodzeń komórki.

Nasuujące się dodatkowe uwagi i komentarze wynikające z lektury rozprawy:

W kontekście sugerowanej przez Kandydatkę możliwej farmakoterapii istotne jest przechodzenie związków przez barierę krew-mózg; co wiadomo na temat przechodzenia amorfrutyny B? W jakich układach/warunkach badano ten aspekt?


Kwestią dodatkową są klinicznie efektywne stężenia związku. Według wiedzy Kandydatki jakiego rzędu mogą być to stężenia; czy da się je odnieść do wydajności ekstrakcji/ syntezy amorfrutyny B?

Kwestia kolejna to trwałość uzyskanych efektów neuroprotektoryjnych. Czy istnieją dane literaturowe odnoszące się do tej kwestii?

Prosiłabym również o odniesienie się do kwestii plejotropowego działania amorfrutyny B, która prezentuje jednoczesne (czasem przeciwstawne) efekty wobec różnych typów komórek (tu: neurony vs mikroglej); czy może być to pożądana strategia farmakologiczna w niedotleniowo-niedokrwienych uszkodzeniach mózgu?

PODSUMOWANIE

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska prezentuje ogólną wiedzę teoretyczną Kandydatki w dyscyplinie nauki medyczne i stanowi oryginalne rozwiązanie istotnego poznawczo i wymagającego metodycznie problemu naukowego. Właściwie zaplanowane i rzetelnie przeprowadzone badania, z zastosowaniem złożonego warsztatu metodycznego i odpowiednich kontroli, pozwoliły na zweryfikowanie neuroprotektoryjnego działania selektywnego liganda receptora PPAR γ w procesie uszkodzeń hipoksyjno – ischemicznych komórek nerwowych i zmian fenotypu komórek mikrogleju in vitro. Uzyskane wyniki mają nowatorski i oryginalny charakter o znaczącym potencjale poznawczym, wskazującym na możliwość jego terapeutycznego rozwinięcia w przyszłości.



Doktorantka sprawnie posługuje się szerokim spektrum technik biologicznych i molekularnych, wykorzystując je do rozwiązywania stawianych problemów naukowych. Potrafi jasno przedstawić wyniki badań i interpretować ich znaczenie odnosząc je do istniejącej literatury. Pani mgr Karolina Przepiórska-Drońska wykazała się rozległą wiedzą, samodzielnością, a także umiejętnością krytycznej oceny danych, co rokuje odwagę w podejmowaniu równie wymagających wyzwań naukowych w przyszłości, a przedstawiona rozprawa doktorska dowodzi umiejętności samodzielnego prowadzenia pracy naukowej.

Rozprawa doktorska mgr Karoliny Przepiórskiej-Drońskiej pt. *„Identyfikacja molekularnych mechanizmów działania amorfutyny B w komórkowych modelach hipoksyjno-ischemicznych uszkodzeń mózgu: badania z wykorzystaniem pierwotnych hodowli mysich neuronów i ludzkiej linii mikrogleju”* spełnia warunki określone 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 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 w dyscyplinie nauki medyczne.

Prof. Magdalena Zielińska