



WARSZAWSKI
UNIwersYTET
MEDYCZNY

KATEDRA I ZAKŁAD FARMAKOLOGII DOŚWIADCZALNEJ I KLINICZNEJ

dr hab. n. med. Kamilla Blecharz-Klin

11. 09. 2023, Warszawa

Ocena pracy doktorskiej mgr farm. Igi Wieczorek

Tytuł pracy: Analiza działania modulatorów receptorów dla sfingozyno-1-fosforanu w eksperymentalnych modelach choroby Alzheimerera

Podstawowe dane o kandydatce

Pani Iga Wieczorek w 2018 roku ukończyła jednolite studia magisterskie w Wydziale Farmaceutycznym Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu na podstawie przedstawionej pracy dyplomowej pt.: „Badanie polimorfizmów genu HCRTR1 i oznaczanie stężenia hipokretyny-1 u chorych z migreną”. Praca wykonana w Pracowni Neurobiologii Katedry i Kliniki Neurologii pod kierunkiem prof. dr hab. Jolanty Dorszewskiej, została wyróżniona podczas 53. Wydziałowego Konkursu Prac Magisterskich. Doktorantka została również wyróżniona Medalem Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu za pracę społeczną i osiągnięcia w nauce. W trakcie studiów Pani Iga Wieczorek uczestniczyła w programie Erasmus+ w Wydziale Farmaceutycznym, Uniwersytetu w Walencji (Hiszpania) (2015/2016). W roku 2018 odbyła staż w Instytucie Farmakologii Ogólnej i Toksykologii (Institut für Allgemeine Pharmakologie und Toxikologie, Pharmazentrum, Frankfurt nad Menem, Niemcy) uczestnicząc w projekcie dotyczącym mechanizmów regulacji kinaz sfingozyny oraz zespołu niedoboru liazy sfingozyno-1-fosforanu. Następnie w 2021 odbyła staż w Instytucie Neurobiologii Słowackiej Akademii Nauk w Koszycach wchodząc w skład grupy badawczej prof. Nadezdy Lukacovej zajmującej się urazami rdzenia kręgowego. W 2022 roku ukończyła studia podyplomowe w zakresie organizacji i zarządzania badaniami klinicznymi (Centrum Kształcenia Podyplomowego, Uczelnia Łazarskiego, w Warszawie, praca dyplomowa: „Wybrane aspekty badań klinicznych w chorobie Alzheimerera – amyloid β jako punkt uchwytu dla nowych terapii”).

W 2018 mgr farm. Iga Wieczorek rozpoczęła interdyscyplinarne studia doktoranckie w ramach programu POWER Och!Dok w Pracowni Badań Przedklinicznych Związków Neuroprotektoryjnych i Czynników Środowiskowych, Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. Mirosława Mossakowskiego Polskiej Akademii Nauk w Warszawie.

Mgr farm. Iga Wieczorek kieruje projektem badawczym finansowanym przez Narodowe Centrum Nauki w ramach konkursu Preludium 20 (nr NCN/2021/41/N/NZ5/02036, tytuł projektu: Potencjalne właściwości neuroprotektoryjne modulatorów receptorów dla sfingozyno-1-fosforanu (S1P) (fingolimodu i siponimodu) w toksyczności oligomerów peptydu amyloidu beta. Znaczenie receptorów dla S1P w chorobie Alzheimer).
Jest członkiem Polskiego Towarzystwa Biochemicznego oraz autorką czterech publikacji naukowych i 9 doniesień naukowych.

Doktorantka nie ubiegała się wcześniej o nadanie stopnia doktora.

Uwagi ogólne

Sfingolipidy to zróżnicowana grupa lipidów, które ze względu na wyjątkową strukturę oraz rolę w sygnalizacji komórkowej i kontroli losów neuronów są istotne dla prawidłowego funkcjonowania tkanki nerwowej. Początkowo uznawano je jedynie za budulec błon komórkowych, jednak dzisiaj wiadomo, że ich znaczenie fizjologiczne jest dużo szersze. Uczestnicząc w złożonych szlakach sygnałowych, sfingolipidy przyczyniają się do regulacji takich aktywności komórek nerwowych jak; wzrost, migracja, różnicowanie oraz zaprogramowana śmierć, co czyni je intrygującym obszarem badań i otwiera możliwości potencjalnych interwencji terapeutycznych.

Unikalne właściwości sfingolipidów odkryte na przestrzeni ostatnich lat zmuszają naukowców do zrewidowania poglądów na temat metabolicznych funkcji lipidów oraz roli zaburzeń metabolizmu sfingolipidów w rozwoju stanów patologicznych, w tym chorób neurodegeneracyjnych, do których należy choroba Alzheimer. Obecnie uznaje się, że zmiany poziomu sfingolipidów oraz zaburzenia ich metabolizmu mogą znacząco oddziaływać na funkcjonowanie neuronów i regulować ich przeżycie.

Jednocześnie w odniesieniu do choroby Alzheimer coraz częściej wskazuje się, że występowanie zarówno patologii beta-amyloidu ($A\beta$), jak i białka tau jest niewystarczające, aby w sposób pewny przewidzieć rozwój objawów (łagodnych

zaburzeń poznawczych lub otępienia) u osób bez zaburzeń klinicznych stąd też rośnie zainteresowanie sfingolipidami i ich rolą w patomechanizmie tej choroby. Szczególnie zaburzenia sygnalizacji zależnej od sfingozyno-1-fosforanu (S1P) postrzegane są przez świat naukowy jako czynnik mający związek ze zmianami neurodegeneracyjnymi. Uważa się, że niski poziom S1P w strukturach mózgu kluczowych dla procesów kognitywnych, może wiązać się z upośledzonym usuwaniem A β i koreluje z postępem zmian neurodegeneracyjnych. Jest wysoce prawdopodobne, że dokładne poznanie mechanizmu wzrostu i apoptozy komórek w kontekście działania sfingolipidów umożliwi rozwój nowych metod leczenia opartych na punktach uchwytu w przestrzeni sfingolipidowych szlaków transmisji sygnału.

Kontynuacja badań nad sfingolipidowymi szlakami transmisji sygnału i możliwości ich modulacji są więc potrzebne zarówno ze względów poznawczych jak i aplikacyjnych.

Badań tych podjęła się mgr farm. Iga Wieczorek weryfikując działanie modulatorów receptorów dla sfingozyno-1-fosforanu jako potencjalnych czynników neuroprotektoryjnych w modelach *in vivo* i *in vitro* choroby Alzheimera.

Obiecującymi związkami w tym zakresie są leki z grupy selektywnych modulatorów receptora S1P: ponesimod, ozanimod (oba leki zarejestrowane do leczenia rzutowo-remisyjnej postaci stwardnienia rozsianego - ang. *multiple sclerosis*, SM) i siponimod (wskazany w leczeniu dorosłych pacjentów z wtórnie postępującą postacią SM) oraz fingolimod (FTY720) - syntetyczny analog sfingozyny, który ze względu na działanie immunomodulujące i interakcje z receptorem S1PR1 na powierzchni limfocytów T znalazł już zastosowanie terapeutyczne i został dopuszczony do leczenia rzutowo-remisyjnej postaci SM. Wysoka lipofilność fingolimodu sprawia, że lek dobrze przechodzi przez barierę krew-mózg ulegając w tkankach ośrodkowego układu nerwowego fosforylacji i wiązaniu z receptorami S1P znajdującymi się na neuronach i komórkach gleju, co może promować wzrost i funkcje neuronów. Słuszność tego założenia potwierdzają badania na materiale klinicznym z których wynika, że poziom S1P w rejonie CA1 hipokampa oraz dolnym zakręcie skroniowym istoty szarej i białej jest niższy u osób z chorobą Alzheimera i negatywnie koreluje z nasileniem objawów oraz postępem zmian neuropatologicznych. Te właściwości stały się podstawą do poszukiwania nowych zastosowań modulatorów S1PR w chorobach neurodegeneracyjnych innych niż SM.

Ocena formalna i merytoryczna pracy

Przedstawiona do recenzji praca doktorska jest merytorycznie, faktograficznie oraz objętościowo obszerna i obejmuje badania zrealizowane w ramach projektu badawczego OPUS 8 (NCN/2014/15/B/NZ3/01049 oraz Preludium 20 (NCN/2021/41/N/NZ5/02036).

Układ i sekwencja poszczególnych podrozdziałów stanowią spójną i logiczną całość, przy czym na podkreślenie zasługuje zachowanie prawidłowych proporcji pomiędzy częścią teoretyczną (36 stron), obszerną, bardzo ładnie i przejrzysto zilustrowaną częścią doświadczalną (57 stron) i dyskusją wyników (22 strony). Graficzne opracowanie pracy jest staranne i obejmuje 25 rycin oraz 6 tabel, które ułatwiają zrozumienie prezentowanych zagadnień. Uwagę zwraca bogata literatura (dokładnie 466 pozycji piśmiennictwa) łącząca się bezpośrednio z tematem badań, która wnosi istotne elementy poznawcze i stanowi podstawę do dyskusji oraz nowych ustaleń.

Wstęp pracy jest przemyślany i zawiera duży ładunek informacji naukowych, podanych w sposób interesujący i przyjazny czytelnikowi. We wstępie autorka przedstawia w zwięzły sposób informacje na temat; epidemiologii choroby Alzheimerera, w tym najnowszych odkryć odnoszących się do jej patomechanizmu, fizjologicznej roli bioaktywnych sfingolipidów w dojrzewaniu i funkcjonowaniu układu nerwowego, a także ich powiązanie z rozwojem chorób neurodegeneracyjnych. Charakteryzuje również związki modulujące działanie receptorów dla sfingozyno-1-fosforanu (S1P).

Cel ogólny i cele szczegółowe pracy doktorskiej zostały jasno nakreślone. Koncentrowały się one na ocenie wpływu modulatorów receptora dla sfingozyno-1-fosforanu (S1P) na zmiany transkrypcyjne i translacyjne białek zaangażowanych w przekaźnictwo synaptyczne, apoptozę, procesy zapalne a także ścieżkę prożyciową zależną od kinazy AKT w doświadczalnych modelach rodzinnej postaci choroby Alzheimerera. Doktorantka zaprojektowała szereg doświadczeń dokonując oceny wpływu mutacji w genie dla APP w dwóch grupach wiekowych transgenicznych myszy szczepu FVB-Tg transfekowanych ludzkim zmutowanym genem dla białka prekursorowego peptydu amyloidu β (APP) (zwierzęcy model rodzinnej postaci choroby Alzheimerera) i na tym tle oceniała działanie fingolimodu. Przeanalizowała wpływ tego nieselektywnego modulatora S1PR na poziom mRNA i immunoreaktywność białek presynaptycznych, poziom mRNA i stopień ufosforylowania białka Tau oraz kinazy AKT i jej białek efektorowych, w dwóch strukturach mózgu: hipokampie oraz korze.

Autorka przeprowadziła również badania *in vitro*, które polegały na ocenie wpływu modulatorów receptora S1P (ufosforylowanego fingolimodu, ponesimodu, siponimodu oraz związków: CYM5541, CYM50308, A971432) na żywotność komórek, poziom wolnych rodników, potencjał błony mitochondrialnej, a także ekspresję genów kodujących receptory dla S1P, białka pro- i antyapoptotyczne oraz cytokiny prozapalne, w dwóch liniach komórkowych HT22 i BV2 traktowanych oligomerami amyloidu β ($A\beta$).

Metodyka badań została starannie dobrana i dość szczegółowo opisana. Zastosowane metody należą do ogromnie czasochłonnych oraz pracochłonnych procedur i wymagały opanowania szeregu technik badawczych z dziedziny analizy biochemicznej.

Z obowiązku recenzenta chciałabym zwrócić uwagę na konieczność uzupełnienia metodyki o informacje na temat liczebności grup doświadczalnych oraz składu paszy. Podczas lektury nasuwają się również pewne uwagi do ewentualnego rozważenia i rozwinięcia a mianowicie: w części dotyczącej badań *in vivo* Doktorantka nie sprecyzowała czym kierowała się wybierając do doświadczenia samice, jaka była początkowa i końcowa masa ciała myszy, czy oceniano stan zdrowia zwierząt podczas prowadzonych procedur.

W obszernym rozdziale poświęconym wynikom Doktorantka zaprezentowała w sposób czytelny otrzymane dane poddając je precyzyjnemu opracowaniu statystycznemu. Warto podkreślić, że wyniki częściowo opublikowano w *Frontiers in Molecular Neuroscience* w 2021 roku, gdzie Doktorantka jest drugim, równorzędnym autorem pracy. Wyniki badań przeprowadzonych u zwierząt transgenicznych w dużej mierze były negatywne, co może wynikać zarówno z zastosowanego modelu badawczego, niewielkiej liczebności grup jak i zróżnicowanej liczebności prób włączonych do analizy statystycznej (jakie były kryteria włączenia do analizy?). W zastosowanym modelu doświadczalnym nadekspresja ludzkiego zmutowanego genu dla APP wywierała istotny, zależny od wieku wpływ na sygnalizację zależną od kinazy AKT jedynie w hipokampie myszy. Doktorantka na podstawie otrzymanych wyników wysunęła wniosek, że fingolimod może częściowo przywracać zaburzoną ekspresję genów kodujących białka presynaptyczne u myszy z mutacją londyńską w genie dla APP, co może mieć bezpośrednie przełożenie na poprawę przekazywania synaptycznego i nasilenie zmian patologicznych. Żałuję, że Doktorantka nie pokusiła się o wykonanie

41

badan behawioralnych oceniających procesy uczenia się i pamięci, które ułatwiłyby interpretację zmian zaobserwowanych w strukturach OUN.

W odniesieniu do badań *in vitro* wykazano, że zastosowanie modulatorów receptorów dla S1P zmniejsza parametry stanu zapalnego w linii komórkowej HT22, natomiast w linii komórek BV2 te same związki pogłębiały niekorzystne zmiany wywołane przez A β . Dodatkowo wykazano, że fingolimod zmniejszał wywołany A β wzrost ekspresji genu dla prozapalnej IL-6 w komórkach linii HT22. Wpływ modulatorów S1PR na białka kompleksu SNARE widoczne były jedynie u zwierząt starszych - 12 miesięcznych, co jest zgodne z przewidywaniami i wskazuje na istotną rolę sygnalizacji zależnej od S1P w zaawansowanych stadiach choroby Alzheimera. Ważną obserwacją jest również wykazanie, że w linii komórkowej HT22 agonisty receptorów S1PR4 oraz S1PR5 przywracają do wartości kontrolnych poziom mRNA antyapoptycznego białka Bcl-2 obniżony podaniem A β . Graficzne opracowanie wyników nie budzi zastrzeżeń, jednak opis rycin wymaga sprecyzowania do jakich testów statystycznych odnoszą się poszczególne znaczniki.

Dyskusja uzyskanych wyników została przeprowadzona interesująco i wnikliwie, szczególnie w aspekcie najnowszych odkryć. Doktorantka we właściwy sposób przedstawiła swoje wyniki w kontekście badań zaprezentowanych przez innych autorów zachowując krytyczny stosunek do własnych osiągnięć, co jest dowodem dojrzałości naukowej. Ponadto sposób cytowania jest bezbłędny i profesjonalny.

Reasumując, rozprawę doktorską Pani mgr Igi Wieczorek oceniam bardzo wysoko, a przytoczone drobne uwagi w niczym nie umniejszają jej dużej wartości poznawczej i aplikacyjnej. Praca wnosi szereg elementów nowości naukowej, rozszerza wiedzę o nowe kierunki działania modulatorów S1PR oraz ich mechanizm molekularny a także otwiera perspektywy dalszych ciekawych i potrzebnych badań. Warte podkreślenia jest również staranne przygotowanie redakcyjne i edytorskie pracy.

W mojej ocenie, przedstawiona praca spełnia wszystkie wymagania stawiane rozprawom na stopień doktora zawarte w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2023 r. poz. 742). Ponadto ze względu na wagę zagadnienia i staranne przeprowadzenie badań wnioskuje o wyróżnienie pracy.

Mam zaszczyt przedstawić Wysokiej Radzie Naukowej Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. Mirosława Mossakowskiego Polskiej Akademii Nauk

w Warszawie wniosek o dopuszczenie Pani Igi Wieczorek do dalszych etapów
przewodu doktorskiego i jednocześnie wnoszę o wyróżnienie pracy.

Dr hab. n. med. Kamilla Blecharz-Klin

11.09.2023

Kamille Blecharz-Klin