

G7R-1-00242-03-08

SPSK im. Prof. W. Orłowskiego CMKP
Księga Rejestrowa 000000018622
ODDZIAŁ KLINICZNY NEUROLOGII I EPILEPTOLOGII
00-416 Warszawa, ul. Czerniakowska 231
tel. 22 58 41 127; 22 58 41 306; 22 629 43 49
00000018622-01(Cz. V Kodu)-008(Cz. VII Kodu)-4220(Cz. VIII Kodu)
Regon: 000290833-00030 NIP: 526-606-68-58

Warszawa, 5.10.2023

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr farm. Igi Wieczorek „Analiza działania modulatorów receptorów dla sfingozyno-1-fosforanu w eksperymentalnych modelach choroby Alzheimer’a” na prośbę Komisji ds. Przewodów i Postępowań Doktorskich Rady Naukowej Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. Mirosława Mossakowskiego PAN.

Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne

Choroba Alzheimer’a jest chorobą zwyrodnieniową mózgu o olbrzymim znaczeniu społecznym. Objawami są postępujące zaburzenia pamięci oraz zachowania, które z czasem całkowicie uniemożliwiają prawidłowe funkcjonowanie chorego w codziennym życiu i wykonywanie pracy.

Mechanizmy powstawania objawów klinicznych w chorobie Alzheimer’a nie są całkowicie poznane, nie ma też leczenia przyczynowego, więc badania prowadzone przez Kandydatkę należy uznać w pełni za uzasadnione. Cele pracy są ambitne.

Ocena formalna rozprawy:

Praca została wykonana w Instytucie Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. Mirosława Mossakowskiego PAN w Warszawie.

Wyniki zamieszczone w rozprawie doktorskiej zostały częściowo opublikowane w pracy: Jęsko H. Wieczorek I. i wsp. *Front Mol Neurosci* 2021 (nie znalazłam oświadczenia Współautora pracy o zgodzie na wykorzystanie części materiału do rozprawy doktorskiej).

Podano finansowanie prac w ramach projektów badawczych NCN Opus 8 i Preludium 20.

Promotor:

Prof. dr hab. n. med. Robert Piotr Strosznajder

Rozprawa doktorska liczy 164 strony, zawiera: spis treści i skrótów, wstęp, cele pracy, materiał i metody, wyniki, dyskusja, podsumowanie i wnioski, streszczenie w języku polskim i angielskim, literaturę i innowacyjność rozprawy.

Podano w pracy, że projekt uzyskał zgodę IV Lokalnej Komisji Etycznej do Spraw Doświadczeń

na Zwierzętach na przeprowadzenie badania i zgodę Ministerstwa Środowiska na zamknięte użycie organizmów genetycznie zmodyfikowanych.

Ocena merytoryczna rozprawy:

We wstępie Kandydatka przedstawia epidemiologię i klasyfikację choroby Alzheimera, patomechanizm (amyloid β , białko tau, zaburzenia przewodnictwa synaptycznego, zaburzenia mitochondrialne, neurozapalenie), bioaktywne sfingolipidy ze szczególną uwagą ich roli w chorobach neurodegeneracyjnych oraz omawia związki działające na receptory sfingozyno-1-fosforanu S1P. Fragmenty te są przedstawione w sposób staranny i nowoczesny (także przejrzyste ryciny).

Kandydatka nie poświęca jednak uwagi zaburzeniom naczyniowym i nie przedstawia aktualnej wiedzy dotyczącej ich wpływu na procesy zwyrodnieniowe.

Cele pracy są określone na str 45.

Celem ogólnym rozprawy było zbadanie wpływu modulatorów receptorów dla sfingozyno-1-fosforanu na zmiany na poziomie transkrypcyjnym i translacyjnym wybranych białek zaangażowanych w: przekazywanie synaptyczne, apoptozę, proces zapalny oraz ścieżkę prożyciową zależną od kinazy AKT w doświadczalnych modelach choroby Alzheimera.

Podano także cele szczegółowe.

Materiały i Metody

Badania przeprowadzono z wykorzystaniem zwierząt laboratoryjnych i modeli komórkowych.

Metody nowoczesne, rzetelnie i adekwatnie opisano dokładnie na str. 46-61

Badania *in vivo* prowadzono na modelu rodzinnej postaci choroby Alzheimera - 3 i 12-miesięcznych transgenicznych myszach szczepu FVB-Tg transfekowanych ludzkim zmutowanym genem dla APP (myszy APP+) (mutacja londyńska).

Grupę kontrolną stanowiły myszy bez odziedziczonego transgenu (myszy APP).

Przez 14 dni zwierzętom podawano dootrzewnowo fingolimod (modulator S1PR1,3-5) w dawce 1 mg/kg m.c. lub jego nośnik (0,9% NaCl). Korę mózgu i hipokamp wykorzystywano do analizy zmian ekspresji genów oraz immunoreaktywności/poziomu ufosforylowania białek. W doświadczeniach na zwierzętach skupiono się na białkach presynaptycznych zaangażowanych w fuzję pęcherzyków synaptycznych z błoną presynaptyczną i uwalnianie

neuroprzekaźnika do szczeliny synaptycznej (białka kompleksu SNARE i białka regulatorowe tego kompleksu), ścieżce prożyciowej zależnej od kinazy AKT i fosforylacji białka Tau.

Badania *in vitro* przeprowadzono na komórkach linii HT22, BV2 i komórkowym modelu toksyczności oligomerów A β . Używano ufosforylowany fingolimod, siponimod, pomesimod, CYM 5541, CYM50308 i A971432. Wykorzystano metody spektrofotometryczne (badanie żywotności komórek przy użyciu testu MTT, oznaczanie poziomu białka metodą BCA), metody fluorymetryczne (oznaczanie wolnych rodników metodą DCF i potencjału błony mitochondrialnej). Analizę ekspresji genów (izolacja RNA i trawienie DNA, odwrotna transkrypcja, reakcja łańcuchowa polimerazy w czasie rzeczywistym) oraz immunodetekcja białek metodą Western Blot.

Zamieszczono opis metod analizy statystycznej (strona 61).

Wyniki i wnioski

Opis wyników przedstawiony przez Kandydatkę także w rycinach i tabelach przygotowanych bardzo starannie i rzetelnie.

Wyniki uzyskane w badaniach *in vivo* wykazały, że mutacja londyńska w genie dla APP powoduje zmiany w hipokampie, a nasilenie zależało od wieku zwierząt/zaawansowania choroby. Mutacja w genie dla APP wpływała na ekspresję białek presynaptycznych głównie na poziomie transkrypcyjnym, natomiast wpływ tej mutacji na prożyciową ścieżkę zależną od AKT miało miejsce wyłącznie na poziomie modyfikacji potranslacyjnych. Skuteczność fingolimodu ograniczona do zmian w ekspresji genów dla białek presynaptycznych w grupie 12-miesięcznych myszy .

Wyniki uzyskane w badaniach *in vitro* wskazały na mierny potencjał apoptotyczny A β o w badanych liniach komórkowych. Wyraźne działanie prozapalne A β o było silniej zaznaczone w mikrogleju. Modulacja receptorów dla S1P w komórkach HT22 wykazała działanie antyapoptotyczne, a także w niewielkim stopniu może łagodzić stan zapalny. Natomiast te same związki w komórkach BV2 miały tendencję do pogłębiania wywołanych przez A β o zmian zapalnych oraz proapoptotycznych.

Dyskusję Kandydatka przeprowadziła sprawnie, posługując się odpowiednim, nowoczesnym piśmiennictwem (bardzo starannie przygotowane, także redakcyjnie 466 pozycji), a sposób prowadzenia dyskusji świadczy o dobrej wiedzy w tym zakresie.

Podsumowanie i wnioski na stronie 124 są odpowiedzią na cele pracy.

W badaniach *in vivo* zaobserwowano negatywny wpływ mutacji londyńskiej w genie dla APP na ekspresję genów dla białek presynaptycznych oraz na prożyciową ścieżkę sygnałową zależną od kinazy AKT. Zastosowanie fmgolimodu przeciwdziało wywołanym przez mutację londyńską zmianom w ekspresji genów kodujących białka presynaptyczne u 12-miesięcznych zwierząt APP+, co wskazuje na istotne znaczenie sygnalizacji zależnej od S1P w regulacji przekąźnictwa synaptycznego w bardziej zaawansowanych stadiach choroby. Dodatkowo badania *in vitro* wykazały niekorzystne działanie A β o na ekspresji genów dla białek pro- i antyapoptotycznych, cytokin prozapalnych i funkcjonowanie mitochondriów.

Kandydatka pisze: „Wyniki doświadczeń *in vitro* wykazały, że efekt modulacji receptorów dla S1P w toksyczności A β o może się różnić w zależności od linii komórkowej, co należy uwzględnić w dalszych badaniach dotyczących zastosowania tych związków”.

Przedstawione opinie świadczą o dojrzałości naukowej Kandydatki i całkowicie się z nimi zgadzam.

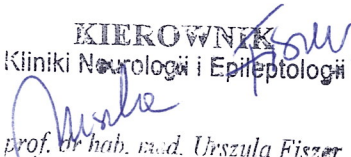
W mojej ocenie cenny jest fragment dotyczący innowacyjności rozprawy (str. 135)

Podsumowanie

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr farm. Igi Wieczorek „Analiza działania modulatorów receptorów dla sfingozyno-1-fosforanu w eksperymentalnych modelach choroby Alzheimera” przedstawia oryginalne rozwiązanie problemu naukowego. Praca ma nowatorski charakter, wykorzystano nowoczesne techniki badawcze.

Doktorantka wykazała ogólną wiedzę teoretyczną i umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478 zm.).

Wniosuję do Rady Naukowej Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. Mirosława Mossakowskiego PAN o dopuszczenie mgr farm. Igi Wieczorek do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu, dyscyplinie nauki medyczne.

KIEROWNIK
Kliniki Neurologii i Epileptologii

prof. dr hab. med. Urszula Fiszor