

Prof. dr hab. Stanisław Okrasa
Katedra Fizjologii Zwierząt
Wydział Biologii i Biotechnologii
UWM w Olsztynie
10-718 OLSZTYN
ul. Oczapowskiego 1A

Ocena rozprawy doktorskiej mgr Joanny Rzemieniec
pt.: "Neuroprotekcynny potencjał raloksyfenu i 3,3'-diindolometanu w modelu
hipoksji: badania na komórkach nerwowych myszy w hodowlach pierwotnych *in vitro*"

OGÓLNA CHARAKTERYSTYKA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Przedstawiona do oceny **praca doktorska Pani mgr Joanny Rzemieniec** została wykonana w Zakładzie Neuroendokrynologii Doświadczalnej Instytutu Farmakologii Polskiej Akademii Nauk w Krakowie, pod kierunkiem dr hab. Małgorzaty Kajty. Na rozprawę doktorską składają się trzy – niżej wyszczególnione – prace oryginalne, opublikowane w języku angielskim w czasopismach z listy JCR, których łączny współczynnik oddziaływania IF wynosi 13,929 (za 5-letni okres IF=13,331), a punktacja wg MNiSW – 105.

1. Rzemieniec J, Litwa E, Wnuk A, Gołas A, Krzeptowski W, Kajta M, Neuroprotective action of raloxifene against hypoxia-induced damage in mouse hippocampal cells depends on Er α but not Er β or GPR30 signalling. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2015; 146:26-37. IF₂₀₁₅= 3,985; 5-letni IF=4,136; MNiSW=30.
2. Rzemieniec J, Litwa E, Wnuk A, Lason W, Krzeptowski W, Kajta M. Selective Aryl Hydrocarbon Receptor Modulator 3,3-Diindolylmethane Impairs AhR and ARNT Signaling and Protects Mouse Neuronal Cells Against Hypoxia. *Mol Neurobiol.* 2016; 53: 5591-606. IF₂₀₁₆=6,190; 5-letni IF=5,392; MNiSW=40.
3. Rzemieniec J, Litwa E, Wnuk A, Lason W, Kajta M. Bazedoxifene and raloxifene protect neocortical neurons undergoing hypoxia via targeting Era and PPAR- γ . *Mol Cell Endocrinol.* 2017 Aug 30. Pii: S0303-7207(17)30450-1. Doi: 10.1016/j.mce.2017.08.014. IF₂₀₁₆=3,754; 5-letni IF=3,803; MNiSW=35.

We wszystkich wymienionych publikacjach Doktorantka jest pierwszym autorem, zaś Pani Promotor pełniła rolę autora korespondującego. Dołączono także oświadczenia Współautorów, wskazujące na wysoki udział Doktorantki w przeprowadzeniu badań przedstawionych w załączonych publikacjach. Prezentowane badania były finansowane w ramach grantu przyznanego przez NCN (Nr 2012/01N/NZ3/04786) oraz ze środków MNiSW w formie Stypendium Doktoranckiego KNOW, a także specjalnego stypendium L'Oreal-UNESCO dla Kobiet w Nauce. Rozprawa doktorska mgr J. Rzemieniec, oprócz kopii ww. publikacji, zawiera *Autoreferat*, obejmujący: wykaz publikacji stanowiących Jej osiągnięcie badawcze, merytoryczne wprowadzenie do podjętego problemu badawczego

pt. *Wstęp*, prezentację *Hipotezy badawczej* i *Celu* badań, a następnie – *Metodyki* i *wyników* badań opisanych w opublikowanych pracach oraz *Dyskusji* im poświęconej. W *Autoreferacie* zamieszczono również *Podsumowanie*, *Wnioski* i *Wniosek końcowy* oraz *Bibliografię*, zawierającą 161 pozycji cytowanego piśmiennictwa, a także – *Wykaz stosowanych skrótów* oraz *Streszczenia* pracy w języku polskim i angielskim.

MERYTORYCZNA ANALIZA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Oceniana rozprawa doktorska jest poświęcona opracowaniu modelu badania niedotlenienia mózgu *in vitro* oraz określeniu efektów działania raloksifenu i 3,3'-diindolometanu (DIM) w komórkach nerwowych myszy poddanych hipoksji, ze szczególnym uwzględnieniem interakcji wybranych substancji z receptorami estrogenowymi (Era, Er β i GPR30), receptorem węglowodorów aromatycznych (AhR) i receptorem aktywowanym przez proliferatory peroksysomów typu *gamma* (PPAR- γ). Niedotlenienie mózgu towarzyszy różnym jednostkom chorobowym, a jego wystąpienie i konsekwencje stanowią bardzo poważny problem medyczny. Estrogeny, oprócz udziału w regulacji funkcji fizjologicznych różnych narządów obwodowych, uczestniczą również w regulacji wielu procesów w ośrodkowym układzie nerwowym; m.in. stymulują proliferację i różnicowanie macierzystych komórek nerwowych, modulują plastyczność synaptyczną i neurogenezę, a także wpływają na aktywność różnych systemów neuronalnych. Ponadto, działając przez różne typy receptorów estrogenowych, wykazują działanie neuroprotekcjne m.in. poprzez hamowanie apoptozy i stresu oksydacyjnego, a także stymulację ekspresji czynników neurotroficznych. Jednakże, pomimo właściwości neuroprotekcyjnych, zastosowanie estrogenów w leczeniu udaru mózgu jest niemożliwe ze względu na ich niekorzystne działanie uboczne. Z kolei, AhR w połączeniu z białkiem ARNT, pełniącym funkcję translokatora jądrowego, m.in. uczestniczy w aktywacji ekspresji genów cytochromu P450 i jest regulatorem metabolizmu ksenobiotyków. Późniejsze badania wykazały, iż receptor ten może odgrywać ważną rolę w kontroli neurogenezy oraz procesów zapalnych i hematopoezy. Jego aktywacja może prowadzić do apoptozy komórek nerwowych, a blokowanie wywołuje efekt neuroprotekcjny. Niestety, udarowi mózgu towarzyszy wzrost ekspresji AhR i ARNT. Innym receptorem bardzo powiązany z procesami zachodzącymi w układzie nerwowym jest PPAR- γ , który wykazuje właściwości neuroprotekcjne. Funkcja tego receptora głównie polega na kontroli metabolizmu glukozy i kwasów tłuszczowych, wrażliwości komórek na insulinę, a także procesów zapalnych. Pełni on ponadto ważną rolę w regulacji proliferacji, różnicowania i apoptozy macierzystych komórek nerwowych, a jego stymulacja chroni komórki nerwowe przed uszkodzeniami wywołanymi niedokrwieniem. Biorąc pod uwagę właściwości receptorów: estrogenowych, AhR i PPAR- γ , podjęcie badań nad opracowaniem modelu badawczego *in vitro*, który pozwala na testowanie ich ligandów w warunkach hipoksji i równoczesne zastosowanie tego modelu do określenia neuroprotekcjnego potencjału wybranych selektywnych modulatorów powyższych receptorów było bardzo trafnym i w pełni uzasadnionym przedsięwzięciem do realizacji w ramach pracy doktorskiej.

We *Wstępie*, Doktorantka przedstawia patofizjologię niedotlenienia mózgu i powiązanie z nim receptorów: estrogenowych, AhR i PPAR- γ . Dokładnie opisuje neuroprotektoryjny potencjał estrogenów i receptorów estrogenowych, podkreśla ryzyko stosowania ich w klinice i wskazuje możliwość wykorzystania selektywnych modulatorów receptorów estrogenowych (SERMs) jako alternatywę dla estrogenów. Rozpatruje także możliwość terapeutycznego oddziaływania poprzez receptor węglowodorów aromatycznych w stanach niedotlenienia mózgu oraz receptor aktywowany przez aktywatory peroksydomów typu *gamma* jako potencjalny punkt uchwytu dla nowych leków neuroprotektoryjnych. Zamieszcza również charakterystykę raloksyfenu i 3,3'-diindolometanu (DIM) jako przedstawicieli selektywnych modulatorów – odpowiednio receptorów estrogenowych (SERMs) oraz receptora węglowodorów aromatycznych (SAhRMs). W oparciu o informacje wprowadzające, opracowane na podstawie najnowszego piśmiennictwa, formułuje hipotezę badawczą, która zakłada, że: 1/ raloksyfen i DIM chronią komórki nerwowe przed uszkodzeniem wywołanym hipoksją; 2/ w neuroprotektoryjne działanie raloksyfenu zaangażowane są receptory estrogenowe i PPAR- γ oraz 3/ neuroprotektoryjne działanie DIM wiąże się z hamowaniem szlaku angażującego AhR i równoczesną aktywacją szlaku Er β . Szczegółowe cele podjętych przez Doktorantkę badań obejmują:

- 1) opracowanie i charakterystykę modelu niedotlenienia komórek nerwowych hipokampa oraz kory mózgu w hodowli *in vitro*;
- 2) określenie efektów działania raloksyfenu i 3,3'-diindolometanu w komórkach nerwowych myszy poddanych hipoksji w warunkach *in vitro*;
- 3) badanie mechanizmów neuroprotektoryjnego działania raloksyfenu w hipoksji, tj. jego wpływu na indukowane hipoksją procesy apoptotyczne i ekspresję Er α , Er β , GPR30 oraz PPAR- γ ;
- 4) zbadanie mechanizmów neuroprotektoryjnego działania DIM w hipoksji: tj. jego wpływu na indukowane hipoksją procesy apoptotyczne i ekspresję receptorów AhR i Er β oraz ARNT.

Przedstawione cele rozprawy doktorskiej jasno określają kierunki weryfikacji przyjętej hipotezy badawczej i są zapowiedzią interesujących badań. Nasuwa się jednak pytanie o to, dlaczego drugoplanowo potraktowano badania z wykorzystaniem innego selektywnego modulatora receptorów estrogenowych (trzeciej generacji) – bazedoksyfenu, które opisano w trzeciej publikacji, ale nie uwzględniono w celach pracy.

Zaplanowane badania przeprowadzono z wykorzystaniem opracowanego modelu niedotlenienia komórek nerwowych hipokampa oraz kory mózgu w warunkach *in vitro*. Na szczególne podkreślenie zasługuje różnorodność metod, które odpowiednio dobrano do przeprowadzenia zaplanowanych doświadczeń. Wśród nich są m.in. następujące techniki badawcze: oznaczanie poziomu uwalniania dehydrogenazy mleczanowej, pomiar aktywności kaspazy 3, oznaczanie błonowego potencjału mitochondrialnego, barwienia z użyciem Hoechst 33342 i kalceiny AM, oznaczanie reaktywnych form tlenu, ilościowa analiza qPCR ekspresji genów (*Esr1 i 2, Gpr30, Ahr, Arnt, Pparg, Cyp19a1, Hif1a*), wyciszanie ekspresji genów przy użyciu specyficznych siRNA (*Esr1 i 2, Gpr30, Ahr, Arnt, Pparg*), oznaczanie

białek przy pomocy analizy Western-blot (AhR, ARNT, ER α i β , GPR30, PPAR- γ , CYP1A1) i testów immunoenzymatycznych ELISA (AhR, ARNT, ER α i β , GPR30, PPAR- γ) oraz barwienie immunofluorescencyjne i mikroskopia konfokalna. Powyższe metody wyszczególniono w streszczeniach poszczególnych publikacji zamieszczonych w *Autoreferacie* oraz dosyć szczegółowo opisano w załączonych publikacjach.

Badania przeprowadzone przez mgr Joannę Rzemieniec w ramach pracy doktorskiej zostały zaprezentowane w trzech pracach opublikowanych w wysoko punktowanych czasopismach, takich jak: *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, *Molecular Neurobiology* oraz *Molecular and Cellular Endocrinology*. Oznacza to, że spełniły wysokie wymagania redakcji tych czasopism i uzyskały pozytywne opinie recenzentów wydawniczych. Dostarczyły one wiele interesujących i wartościowych wyników. Do najważniejszych spośród nich zaliczyłbym kilka wymienionych poniżej.

1. Wykazanie, że raloksyfen wywiera silny, ochronny wpływ na komórki nerwowe hipokampa poddane niedotlenieniu, który okazał się być niezależny od kaspazy 3, a ściśle powiązany z receptorem estrogenowym typu α . Kluczowa rola tego receptora w działaniu raloksyfenu została potwierdzona poprzez odnotowanie znacznego wzrostu białka receptorowego po zastosowaniu raloksyfenu oraz zniesienie efektu jego działania po wyciszeniu ekspresji genu *Esr1* przy pomocy specyficznego siRNA.
2. Wykazanie silnego działania neuroprotekcijnego selektywnego modulatora receptora węglowodorów aromatycznych – 3,3’ diindolometanu (DIM) w komórkach hipokampa poddanych hipoksji, które było powiązane z hamowaniem wzrostu aktywności kaspazy 3 oraz udokumentowanie znaczenia szlaku ścieżki sygnałowej receptora węglowodorów aromatycznych AhR/ARNT/CYP1A1 w działaniu DIM, który blokował aktywność tej ścieżki.
3. Wykazanie neuroprotekcijnego działania raloksyfenu (i bazedoksyfenu) na komórki nerwowe kory mózgowej myszy poddane hipoksji, w które zaangażowane są – na zasadzie współdziałania – receptory aktywowane przez proliferatory peroksysomów typu γ oraz receptor estrogenowy α . W badaniach nie stwierdzono wpływu pojedynczego użycia siRNA specyficznego dla *Esr1* lub *Pparg* na neuroprotekcyjne działanie raloksyfenu, jednakże równoczesne wyciszenie obydwu genów znacznie osłabiło jego ochronny potencjał.
4. Wykazanie różnicy w neuroprotekcijnym oddziaływaniu raloksyfenu na komórki nerwowe hipokampa i kory mózgowej myszy. Mianowicie, stwierdzono, że wyciszenie ekspresji *Esr1* przy pomocy specyficznego siRNA znosi neuroprotekcyjny potencjał raloksyfenu w hipokampie, natomiast nie zmienia go w korze mózgowej, a jest dopiero skuteczne przy równoczesnym wyciszeniu *Pparg*. Stwierdzono ponadto, że w komórkach hipokampa poziom Era jest 7-krotnie niższy, zaś poziom receptora PPAR- γ jest 1,5-krotnie wyższy w porównaniu z komórkami kory mózgowej myszy.

Zastanawiający jest brak spodziewanych efektów działania ligandów (agonistów i antagonistów) badanych receptorów (estrogenowych, AhR i PPAR- γ), używanych w celu potwierdzenia udziału tych receptorów w mechanizmie działania raloksyfenu lub DIM.

Doktorantka sugeruje, że przyczyną tego mogły być zmiany pH pożywki, które mogły spowodować zmiany struktury białek receptorowych. Nasuwa się pytanie, czy pH pożywki było sprawdzane podczas prowadzonej hodowli komórek. Czy Doktorantka bierze także pod uwagę jakież inne przyczyny tej sytuacji? Przedstawione wyniki nasuwają także uzasadnienie do podjęcia w przyszłości badań, które pozwolą wyjaśnić stopień zaangażowania w procesy neuroprotekcyjne AhR – w korze mózgowej oraz PPAR- γ – w hipokampie.

Podsumowując wyniki badań przeprowadzonych przez Doktorantkę, należy wysoko ocenić ich dużą wartość poznawczą, ponieważ pozwoliły one wyjaśnić mechanizm działania raloksyfenu i DIM na komórki nerwowe hipokampa oraz określić potencjał neuroprotekcyjny raloksyfenu w odniesieniu do komórek nerwowych kory mózgowej myszy. Na podkreślenie zasługuje bardzo wnikliwe przeanalizowanie uzyskanych wyników w dyskusjach zamieszczonych w poszczególnych pracach i *Autoreferacie* oraz ich zbiorcze podsumowanie dokonane w *Autoreferacie*. Efekty badań przeprowadzonych przez Doktorantkę dodatkowo zostały w sposób bardzo przejrzysty zilustrowane na schemacie załączonym do *Wniosku końcowego*. Na uznanie zasługuje przygotowanie trzech bardzo dobrze napisanych prac oryginalnych i opublikowanie ich w wysoko notowanych czasopismach, o czym świadczą wcześniej przytoczone wskaźniki naukometryczne. Wobec bardzo wysokiej oceny jakości tych publikacji, nie mają znaczenia drobne usterki, które prawdopodobnie wkradły się podczas końcowego etapu składania tekstu publikacji 1, takie jak: zgubienie końcówki nagłówka przy *Tabeli 2* oraz drobna zmiana numeru grantu NCN.

Ze względu na fakt, że znaczna część badań przeprowadzonych w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej dotyczyła roli receptorów estrogenowych w procesach związanych z neuroprotekcją, pragnę z nieco szerszej perspektywy skierować do Doktorantki pytanie. Mianowicie, czy na podstawie znanego Pani piśmiennictwa naukowego można porównawczo scharakteryzować wpływ innych hormonów steroidowych na komórki nerwowe.

PODSUMOWANIE

W podsumowaniu pragnę stwierdzić, że rozprawa doktorska mgr Joanny Rzemieniec zawiera liczne i wartościowe wyniki badań, które opisują mechanizm neuroprotekcyjnego oddziaływania raloksyfenu zarówno na komórki nerwowe hipokampa jak i kory mózgowej oraz 3,3'-diindolometanu na komórki nerwowe hipokampa myszy. Badania przeprowadzone z wykorzystaniem różnorodnych procedur i zawansowanych metod badawczych pozwoliły określić stopień zaangażowania receptorów estrogenowych, AhR i PPAR- γ w tych mechanizmach oraz wykazać różnice w działaniu raloksyfenu – zależne od badanej struktury ośrodkowego układu nerwowego. Uzyskane przez Doktorantkę wyniki, oprócz wartości poznawczej, mogą mieć znaczenie aplikacyjne jako podstawa do opracowania nowych leków, działających za pośrednictwem receptorów ER α , AhR i/lub PPAR- γ , które będą mogły mieć zastosowanie w farmakoterapii niedotlenienia mózgu. Z pełnym przekonaniem mogę stwierdzić, że w przedstawionej do oceny pracy doktorskiej w pełni został osiągnięty zamierzony cel naukowy, a Doktorantka wykazała się w niej bardzo

dobrym opanowaniem warsztatu badawczego i dobrą znajomością piśmiennictwa z zakresu tematyki prowadzonych badań. Należy dodać, że Doktorantka – poza trzema publikacjami stanowiącymi rozprawę doktorską – ma w dorobku publikacyjnym 8 prac oryginalnych, które zostały opublikowane w czasopismach z listy JCR.

WNIOSEK KOŃCOWY

W zakończeniu pragnę stwierdzić, że przedstawiona do oceny rozprawa zatytułowana **”Neuroprotekcynny potencjał raloksyfenu i 3,3’-diindolometanu w modelu hipoksji: badania na komórkach nerwowych myszy w hodowlach pierwotnych *in vitro*”** spełnia wszystkie wymagania – określone w Ustawie nr 595 o Stopniach Naukowych i Tytule Naukowym oraz Stopniach i Tytule w Zakresie Sztuki z dnia 14.03.2003 r. (wraz z późniejszymi zmianami) – stawiane rozprawom doktorskim i w związku z powyższym zwracam się do Rady Naukowej Instytutu Farmakologii PAN w Krakowie z wnioskiem o **dopuszczenie mgr Joanny Rzemieniec do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

Równocześnie, ze względu na szeroki zakres przeprowadzonych badań i wysoki poziom naukowy ocenianej rozprawy oraz opublikowanie wyników badań w formie trzech prac oryginalnych w bardzo dobrych czasopismach, przedkładam Wysokiej Radzie **wniosek dotyczący wyróżnienia rozprawy doktorskiej mgr Joanny Rzemieniec.**

Olsztyn 20.12.2017 r.



Stanisław Okrasa