

OCENA

rozprawy doktorskiej magister Kingi Tylek pt. **Ocena roli ligandów receptora ALX/FPR2 w wyciszaniu procesów zapalnych w ośrodkowym układzie nerwowym: badania w doświadczalnych modelach immunoaktywacji** wykonanej w Instytucie Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk pod kierunkiem prof. dr hab. Agnieszki Basty-Kaim i dr Ewy Trojan.

Stan zapalny jest naturalnym zjawiskiem towarzyszącym wtargnięciu do organizmu patogenów takich jak bakterie, pierwotniaki czy wirusy. Uczestniczące w tym procesie cytokiny prozapalne takie jak IL-1beta, IL-6 lub TNF-alfa, enzymy lityczne (granzymy i perforyny) oraz reaktywne rodniki tlenowe i azotowe warunkują neutralizację patogenów i są z całą pewnością zjawiskiem dla organizmu pozytywnym. Przeciwnie, przedłużający się lub długotrwały stan zapalny jest niekorzystny dla organizmu. Podwyższone lub wysokie poziomy wcześniej wymienionych składowych zaktywowanego układu odpornościowego mogą prowadzić do destrukcji komórek i tkanek w miejscu bądź bliskości ogniska zapalnego. Wiele dowodów wskazuje na wyjątkowo niekorzystne działanie długotrwałego stanu zapalnego wobec komórek ośrodkowego układu nerwowego, a szczególnie wobec neuronów. Dotyczy to nie tylko chorób neurodegeneracyjnych ale w równym stopniu chorób psychicznych. Wśród chorób dotykających współczesnego człowieka depresja wydaje się zajmować poczesne miejsce. Szybko następujące zmiany w środowisku w wyniku rozwoju cywilizacyjnego są niewątpliwie czynnikami stresu i przyczyniają się do wyzwolenie u ludzi z predyspozycją do wystąpienia objawów depresji. Udowodniono, że składowe pobudzonego układu odpornościowego, między innymi czynnikami, uczestniczą w patogenezie choroby Parkinsona bądź chorobie

Azheimera. Podobnie specyficzne fluktuacje w stężeniach cytokin prozapalnych w zaostrzeniu i remisji w schizofrenii sugerują uczestnictwo tych cytokin w patomechanizmie wspomnianej choroby. Dotychczasowe metody zmniejszania stopnia nasilenia stanu zapalnego są prowadzone na drodze farmakoterapii z wykorzystaniem niesteroidowych leków przeciwzapalnych, steroidowych leków przeciwzapalnych lub leków immunosupresyjnych. Liczne i groźne działania niepożądane (szczególnie steroidowych i immunosupresyjnych leków) skłaniają do poszukiwania innych mniej toksycznych a równie skutecznych dróg ochrony tkanki mózgowej przed nasilonym i długotrwałym stanem zapalnym. Taką alternatywną drogą jest aktywacja endogennych mechanizmów tonizujących przebieg zapalenia. Wpierw odkryto silnie przeciwzapalną IL-10 wydzielaną w trzecim dniu zapalenia, a obecnie badane są receptory formylowe jako potencjalne miejsca uchwytu działania leków mających na celu wygaszenie zapalenia. Taką właśnie tematyką zajęła się pani mgr. Kinga Tylek, co jest wyborem w pełni uzasadnionym.

We wstępie Pani mgr. Tylek przedstawiła w sposób zwięzły współczesną wiedzę dotyczącą procesu zapalnego, roli mikrogleju w zapaleniu w obszarze OUN, procesów wyciszania zapalenia, receptorów formylowych, a na koniec rozdziału omówiła planowane do zbadania ligandy receptora formylowego ALX/FPR2.

Wstęp ma konstrukcję przejrzystą, napisany jest starannym i dobrze zrozumiałym językiem i wskazuje, że doktorantka posiada szeroką wiedzę teoretyczną wymaganą do ubiegania się o nadanie stopnia doktora w dyscyplinie nauki medyczne.

Celem pracy było sprawdzenie czy nowe ligandy receptora ALX/FMR2 mogą efektywnie zmniejszać nasilenie stanu zapalnego na poziomie wskazującym na przydatność terapeutyczną u człowieka. Ażeby taką wiedzę osiągnąć doktorantka postanowiła porównać wpływ nowego związku MR39 z znanymi agonistami endogennymi w badaniach na hodowlach mikrogleju oceniając ekspresje genów i poziomy białek cytokin prozapalnych i przeciwzapalnych. W następnym badaniu doktorantka postanowiła zbadać wpływ nowych związków pro-wyciszeniowych AMS21 i CMC23 na parametry zapalenia w hodowlach organotypowych hipokampa. W kolejnym badaniu doktorantka postanowiła ocenić wpływ nowych agonistów receptora formylowego na zaburzenia behawioralne typu depresji. W celu zbadania mechanizmów molekularnych obserwowanych zmian mgr K. Tylek zaplanowała zbadanie działania badanych agonistów na poziom białka ERK1/2, p38, NFkB, STAT oraz NLRP3. Wielkie bogactwo planowanych badań daje szansę na poznanie rzeczywistej siły działania przeciwzapalnego badanych ligandów.

Metody badawcze zostały dobrane prawidłowo. Na pochwałę zasługuje zastosowanie szerokiego wachlarza metod: nowoczesnych metod behawioralnych, hodowli organotypowych, podania do komór bocznych mózgu szczurów ligandów, posługiwanie się przeciwciałami w technice barwienia białek komórkowych w hodowlach, trudnych metod molekularnych tj. QRT-PCR i Western Blot oraz immunoenzymatycznych ELISA.

Doktorantka badała wiele parametrów w celu weryfikacji założonych celów. Należały do nich: test behawioralny Porsolta, uwalnianie LDH, poziom ekspresji genów Cd40, CD68, igf1, IL-6, il-10, IL-12, IL-23, Jak1, Jak2 Stat3 TGF-beta, poziomy białek: IL-1beta, IL-6, IL-10, IL-12/23p40, IL-17A, TGFbeta, SOCS3,

STAT3, ERK1/2, NFkB, p38 poziom kaspazy 3, poziom reaktywnych form tlenowych, wydzielanie tlenu azotu. Wielość oznaczeń wnosi o dużej pracowitości mgr. Tylek, a mnogość zastosowanych metodyk uznanie. Wyniki zostały zobrazowane w postaci słupków lub tabel, są bezproblemowe do oceny. Wyniki istotne statystycznie różnią się od grupy odniesienia co najmniej o 20%, co wnosi o ich potencjalnym znaczeniu biologicznym.

Duża liczba zaprezentowanych wyników stanowi znakomitą podstawę do przeprowadzenia wnikliwej dyskusji.

Postawione cele badawcze, wykorzystane metodyki badawcze oraz uzyskane wyniki wnoszą o umiejętności samodzielnego myślenia naukowego i ogólniej samodzielnego prowadzenia pracy naukowej właściwej dla osoby ubiegającej się o nadanie stopnia naukowego doktora.

Dyskusja obejmuje 12 stron maszynopisu. Jest zwięzła i nie wychodzi poza nurt opracowywanego tematu. Pani mgr. Kinga Tylek omawia w niej potencjalne działanie terapeutyczne ligandów receptora formylowego w leczeniu stanów zapalnych OUN. Doktorantka w sposób poprawny zinterpretowała wyniki swoich badań na tle wyników badań opublikowanych z innych ośrodków zajmujących się rolą zapalenia w OUN. Wyniki uzyskane przez doktorantkę wspierają wyniki otrzymane przez innych autorów, którzy podobnie jak Pani Mgr Tylek zaobserwowali zmniejszenie poziomów składowych stanu zapalnego pod działaniem ligandów receptora formylowego, a ponadto wprowadziły do literatury światowej wiele nowych danych poszerzających wiedzę we wspomnianej tematyce. W sposób akceptowalny tłumaczy trudne wyniki jak np. wzrost ekspresji genu IL-1beta nie poparty wzrostem poziomu białka tej cytokiny. Rozprawa jest zakończona podsumowaniem wyrażonym w ośmiu punktach oraz umiejętnie

sformułowanym ogólnymi dwoma wnioskami przedstawionym wytłuszczonym drukiem, z którego wynika że cel pracy został zrealizowany. Do pracy dołączone są oświadczenia współuczestników publikacji na podstawie których doktorantka napisała pracę doktorską z których wynika, że autorka była głównym wykonawcą we wspomnianych wyżej pracach. W początkowej części pracy autorka zamieściła streszczenie w języku polskim i angielskim.

Zdaniem recenzenta najbardziej wartościowe wyniki przedstawionej do recenzji pracy to:

1. Wykazanie, że zarówno endogenne ligandy receptora ALX/FPR2 jak również nowy egzogeny ligand MR39 działały pro-wyciszeniowo/przeciwzapalnie wobec stymulowanego LPS-em mikrogleju, przy czym farmakokinetyka egzogenego ligandu była lepsza. Ponadto istotne jest ich działanie przez prozapalne molekuly takie jak ERK1/2 oraz NFkB.
2. Wykrycie receptorów wyciszeniowych ALX/FPR2 na mikrogleju, a w mniejszym stopniu na astrocytach i neuronach sugeruje, że stanowi on wspólną i ważną drogę redukcji zapalenia na obszarze OUN.
3. Znalezienie dwóch nowych ligandów receptora ALX/FPR2 zaangażowanym w działanie przeciwzapalne/pro-wyciszeniowe tj. CMC23 działający w bardzo niskich stężeniach oraz AMS21. Wydaje się również ważne znalezienie ścieżek sygnałowych poprzez które one działają.
4. Deficyty behawioralne uzyskane w wyniku immunoaktywacji u szczurów korygowane poprzez ligandy receptora ALX/FPR2 są kolejnym potwierdzeniem roli podwyższonego stężenia cytokin prozapalnych w korze czołowej i hipokampie w wywoływaniu zaburzeń na podobieństwo

psychicznych. Cennym wynikiem jest obserwacja lepszych własnościach farmakokinetycznych związku CMC23 w porównaniu ze ligandem endogennym LXA4.

5. Przedstawione badania stanowią cenną wskazówkę dla chemików do syntezy kolejnych ligandów receptora ALX/FPR2 o przedłużonym działaniu, łatwości przechodzenia przez barierę krew/mózg i niższej toksyczności w porównaniu z aktualnie stosowanymi lekami przeciwzapalnymi.

Przedstawiona do recenzji 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).

Wnoszę do Rady Naukowej Instytutu Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk o dopuszczenie mgr Kingi Tylek do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu, dyscyplinie nauki medyczne.

Pracę doktorską Pani mgr Kingi Tylek oceniam bardzo wysoko i ponadto proszę o wyróżnienie jej pracy.

Wyniki uzyskane w ramach przedstawionej do oceny pracy są nowatorskie bowiem stanowią opracowanie nowych ligandów receptora formylowego i poszerzenia wiedzy na temat już znanych, a ponadto ukierunkowują naukę na nowy kierunek zwalczania zapalenia w OUN. Doktorantka wykazała się ogromną pracowitością, znacznymi umiejętnościami laboratoryjnymi, a również umiejętnością prostego i zrozumiałego opisu uzyskanych rezultatów.

Kierownik Katedry i Zakładu Genetyki Medycznej
Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach

Prof. dr hab. n. med. Jan Kowalski

KIEROWNIK
Katedry i Zakładu Genetyki Medycznej
Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach

Jan Kowalski
prof. dr hab. n. med. Jan Kowalski

15 styczeń, 2024, Sosnowiec

