

dr hab. Danuta Lewandowska, Prof. UG,
Kierownik Pracowni Neurobiologii
Katedra Fizjologii Zwierząt i Człowieka
Wydział Biologii Uniwersytetu Gdańskiego

**Recenzja rozprawy doktorskiej p. mgr Kingi Tylek
pt. „Ocena roli ligandów receptora ALX/FPR2 w wyciszaniu procesów zapalnych w
ośrodkowym układzie nerwowym: badania w doświadczalnych modelach
immunoaktywacji”
przygotowanej pod opieką prof. dr hab. Agnieszki Basta-Kaim i dr Ewy Trojan
w Zakładzie Neuroendokrynologii Doświadczalnej
Instytutu Farmakologii im. Jerzego Maja PAN**

Tematyka pracy mieści się w nurcie badań dotyczących mechanizmów związanych z wygaszaniem stanu zapalnego mózgu drogą wspomagania endogennych procesów przeciwzapalnych, a w szczególności roli egzogennych ligandów receptora ALX/FPR2 z rodziny receptorów formylowych, w przebiegu procesu zapalnego. Wciąż nie w pełni poznane są mechanizmy odpowiedzialne za wygaszanie długotrwałego procesu zapalnego ośrodkowego układu nerwowego (OUN), który stanowi podłoże rozwoju wielu chorób neurodegeneracyjnych. Wspomaganie endogennych procesów przeciwzapalnych w celu wyciszenia stanu zapalnego mózgu przy zachowaniu aktywności pro-zapalnej układu odpornościowego może stanowić obiecującą strategię przydatną w modulowaniu procesów zapalnych w przebiegu wielu chorób OUN, charakteryzujących się procesem zapalnym. Dlatego też praca p. mgr Kingi Tylek dobrze wpisuje się w nurt tych badań a wybór tematu uważam za właściwy, również z uwagi na szersze implikacje, zwłaszcza w zakresie opracowania skutecznych farmakoterapii chronicznego procesu zapalnego. Badania podjęte przez p. mgr Tylek uważam więc za niezwykle istotne.

Oceniana przeze mnie hybrydowa wersja rozprawy doktorskiej, wykonana przez p. mgr Kingę Tylek, składa się z 4 artykułów naukowych, w tym jednej pracy przeglądowej oraz wyników nieopublikowanych badań *in vivo* wykonanych na zwierzęcym modelu uogólnionej immunoaktywacji. Rozprawa doktorska zawiera także oświadczenia współautorów publikacji i artykuły naukowe w oryginale, stanowiące podstawę tej rozprawy. Zasadnicze jej części zostały zawarte w streszczeniu w języku polskim i angielskim, wprowadzeniu, celu badań, zarysie metod zastosowanych w opublikowanych artykułach, będących podstawą rozprawy doktorskiej oraz w nieopublikowanych wynikach badań włączonych do rozprawy, wynikach badań nieopublikowanych, stanowiących część rozprawy

doktorskiej oraz dyskusji. Treść pracy uzupełniono rozdziałem „Podsumowanie i wnioski” oraz bibliografią (nienumerowaną). Praca została przygotowana bardzo starannie i zgodnie z obowiązującymi zaleceniami. Znalazłam jedynie nieliczne potknięcia edytorskie (na przykład strona 7 wykaz skrótów: „CX – kora czołowa (ang. *prefrontal cortex*” oznacza korę przedczołową a nie czołową; strona 41,42,49: „sól fizjologiczna”, zamiast fizjologiczny roztwór soli, strona 44 „Tabela 2, 5 grupa podano NaCl” zamiast 0,9% NaCl; stosowanie kropki zamiast przecinka przy podawaniu danych liczbowych).

We wprowadzeniu, opartym na pracy przeglądowej [1], wchodzącej w skład artykułów stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej, Autorka w sposób jasny i interesujący przedstawiła rolę komórek gwałowych i rodzinę receptorów formylowych w procesach zapalnych i wyciszenia zapalenia oraz scharakteryzowała funkcję receptora ALX/FPR2 i jego endogenne i egzogenne ligandy, w tym nowych mocznikopochodnych agonistów receptora ALX/FPR2 II generacji, powstałych w wyniku międzynarodowej współpracy z grupami badawczymi z Włoch, Niemiec i Stanów Zjednoczonych.

W oddzielnym rozdziale Autorka sformułowała 4 szczegółowe cele, których zadaniem była ocena przeciwzapalnego i pro-wyciszeniowego potencjału nowych zsyntetyzowanych przez ośrodek włoski mocznikopochodnych agonistów receptora ALX/FPR2 w warunkach *in vitro* hodowli pierwotnych mikrogleju, *ex vivo* hodowli organotypowych hipokampa i zweryfikowaniu uzyskanych wyników w modelu immunoaktywacji *in vivo* („sickness behaviour”) w wybranych strukturach mózgu (w korze czołowej i hipokampie) a także wyjaśnienie molekularnych mechanizmów działania badanych agonistów receptora ALX/FPR2.

Cele pracy zostały zrealizowane w bardzo dobrze zaplanowanych doświadczeniach przy zastosowaniu bogatego i zróżnicowanego warsztatu badawczego, obejmującego zarówno metody hodowli pierwotnych komórek mikroglejowych (praca [2]) hodowle organotypowe hipokampa (praca [3]), hodowle organotypowe hipokampa z procedurą eliminowania komórek mikroglejowych (praca [4]), operacje stereotaktyczne, iniekcje dokomorowe oraz metody behawioralne (test Porsolta) (nieopublikowane wyniki badań włączonych do rozprawy doktorskiej). Chciałabym zaznaczyć, że zastosowana w pracy wieloetapowa metodyka badań jest imponująca.

W pracy [2] Autorka przeanalizowała antyoksydacyjne i pro-wyciszeniowe działanie endogennych agonistów receptora ALX/FPR2: LXA4 i AT-LXA4 oraz egzogenne

mocznikopochodnego ligandu tego receptora MR-39 w warunkach *in vitro* modelu zapalenia mózgu. Doktorantka stwierdziła, że MR-39 wykazuje podobne neuroprotektoryjne (zdolność do redukcji wydzielania LDH i hamowania kaspazy-3), antyoksydacyjne (obniżenie poziomu ROS i wydzielania NO) i przeciwzapalne (hamowanie syntezy cytokin pro-zapalnych IL-1 β , TNF- α i IL-6) działanie jak ligandy endogenne, jednak dłużej obserwowane (nawet po 24 h od stymulacji komórek mikroglejowych lipopolisacharydem) i poprzez te same mechanizmy jak ligandy endogenne (ERK1/2 i hamowanie NF- κ B).

W pracy [3] Doktorantka przedstawiła wyniki badań dotyczących neuroprotektoryjnego i pro-wyciszeniowego wpływu syntetycznego agonisty receptora formylowego 2 CMC23 w hodowlach organotypowych hipokampa stymulowanych lipopolisacharydem. Pani mgr Tylek wykazała, że związek CMC23 zmniejsza śmiertelność komórek hipokampa, hamuje wydzielanie LDH, zmniejsza wysiew cytokin pro-zapalnych IL-1 β , IL-6, IL-17 i IL-23 w stężeniach nanomolarnych poprzez aktywację ścieżki STAT3/SOCS3, co zdaniem Autorki wskazuje na jego istotną rolę w stymulacji procesu wygaszania zapalenia.

W kolejnej pracy [4] Autorka wykazała, że związek AMS21 w stężeniu nanomolarnym wywiera neuroprotektoryjny, antyoksydacyjny oraz pro-wyciszeniowy wpływ poprzez występujący na komórkach mikrogleju receptor formylowy ALX/FPR2 w hodowlach organotypowych hipokampa. Doktorantka przeanalizowała mechanizmy przeciwzapalnego działania tego ligandu i stwierdziła, że istotną rolę w tym mechanizmie odgrywa hamowanie ścieżki kanonicznej inflammasomu NLRP3.

Następnie Doktorantka porównała wpływ podania dokomorowego agonistów receptora ALX/FPR2 (endogenny ligand LXA4 oraz zsyntetyzowanych CMC23 i MR-39) na aktywność behawioralną szczurów, mierzoną w teście Porsolta w warunkach kontrolnych i po podaniu LPS (zwierzęcy model immunoaktywacji) oraz na poziom białka TNF- α i IL-1 β w korze czołowej i hipokampie tych zwierząt (badania *in vivo*). Po wnikliwej analizie wyników p. mgr Tylek stwierdziła, że zastosowane ligandy normalizują zaburzenia behawioralne w teście Porsolta (skrócenie czasu bezruchu i wydłużenie czasu pływania szczurów), przy czym najkorzystniejszy efekt obserwowano w przypadku związku CMC23. Ponadto Doktorantka wykazała efekt przeciwzapalny badanych ligandów, mierzony obniżeniem stężenia białek cytokin pro-zapalnych TNF- α i IL-1 β w hipokampie w przypadku wszystkich badanych ligandów oraz w korze czołowej po padaniu LXA4 i CMC23.

Wyniki opisane w 4 artykułach oraz nieopublikowane, stanowiące część rozprawy doktorskiej to zdecydowanie robiąca największe wrażenie część pracy z uwagi na ogromną złożoność i zakres przeprowadzonych badań, jak również na szczegółową i ostrożną analizę. Na podkreślenie zasługuje fakt, że wyniki zostały opublikowane w wysokopunktowanych czasopismach (140 pkt. MNiSW), a w każdym artykule jest po kilkanaście złożonych z kilku paneli rycin, mikrofotografii oraz tabel. Opis części nieopublikowanych wyników, wzbogacono 3 klarownymi, złożonymi z 6 paneli rycinami.

Dyskusję wyników, podzieloną na 3 części, analogicznie do metodologii prowadzonych badań (*in vitro*, *ex vivo*, *in vivo*), Autorka przeprowadziła w sposób interesujący, ostrożnie interpretując uzyskane wyniki, co świadczy o bardzo dobrym zorientowaniu w literaturze i dojrzałości naukowej.

Zakres podjętych badań prezentuje ogólną wiedzę w dyscyplinie nauki medyczne a przedstawione w rozprawie doktorskiej wyniki uważam za istotne i wartościowe. Wykazanie potencjału neuroprotektoryjnego, antyoksydacyjnego, przeciwzapalnego i pro-wyciszeniowego zsyntetyzowanych mocznikopochodnych ligandów receptora formylowego ALX/FPR2 w warunkach *in vitro*, *ex vivo* a także przedstawienie po raz pierwszy właściwości normalizujących związek CMC23 na deficyty behawioralne w teście Porsolta w modelu uogólnionej aktywacji zapalnej stanowi nowość naukową i może mieć istotne znaczenie dla regulacji zaburzonej przez czynniki zapalne homeostazy. Praca p. mgr Tylek stanowi również dobrą podstawę do dalszych badań tego zagadnienia, m.in. w zakresie poszukiwań nowych strategii farmakoterapii wyciszania procesów zapalnych w OUN.

W podsumowaniu chciałabym stwierdzić, że przedstawione w hybrydowej wersji rozprawy doktorskiej wyniki stanowią znaczący wkład w badania nad modulowaniem procesów zapalnych w OUN i stanowią oryginalne rozwiązanie problemu naukowego. Doktorantka jest bardzo dobrze przygotowana pod względem teoretycznym, jak również znajomości wielu trudnych technik metodycznych, do pracy naukowej. Autorka wykazała się umiejętnością rozwiązywania złożonego i ciekawego problemu badawczego, precyzyjnego przeprowadzenia badań oraz dojrzałością do odpowiedniego opracowania uzyskanych oryginalnych wyników.

W odpowiedzi na recenzję proszę o przedyskutowanie następujących kwestii:

1. W opisie wyników nieopublikowanych zabrakło mi informacji o sposobie analizy statystycznej wyników.

2. Na jakiej podstawie ustalono dawkę dla podawanych dokomorowo agonistów receptora ALX/FPR2: LXA4, MR-39 i CMC23?
3. Nie znalazłam również informacji czy w badaniach *in vivo* uwzględniono grupę szczurów z antagonistą receptora ALX/FPR2 (tak jak w badaniach *in vitro*)?

Uważam, że recenzowana praca w pełni spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (t.j. Dz. U. z 2023 r. poz. 742) Na tej podstawie przedkładam Radzie Naukowej Instytutu Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk wnioski o dopuszczenie pani mgr Kingi Tylek do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu, dyscyplinie nauki medyczne.

Ponadto, z uwagi na nowatorstwo badań poparte opublikowaniem wyników w wysokopunktowanych czasopismach oraz zakres wyników znacznie przekraczający ramy pracy doktorskiej składam również wnioski do Rady Naukowej Instytutu Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk o wyróżnienie rozprawy doktorskiej.

Janina Lewandowska

Gdańsk, 3.01.2024 r.