



Katedra i Zakład Farmakologii Doświadczalnej i Klinicznej
Uniwersytet Medyczny w Lublinie
ul. Jaczewskiego 8b, 20-090 Lublin
Telefon sekr. (81) 448 64 50
e-mail: fdik@umlub.pl

Lublin, dn. 29.01.2024

Dr hab. n. med. Zofia Danilczuk, prof. Uczelni

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr 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

Przedłożona mi do recenzji rozprawa doktorska mgr Kingi Tylek ma formę hybrydową, której podstawą są cztery oryginalne artykuły, opublikowane w latach 2021-2023, w renomowanych czasopismach o łącznym wskaźniku oddziaływania *impact factor* 23,626 oraz dodatkowo zawiera uzupełniające nieopublikowane jeszcze badania własne. Stanowi więc ona kompletne dzieło, spełniające warunki formalne stawiane rozprawom doktorskim. Należy podkreślić, że w opublikowanych artykułach mgr Kinga Tylek jest pierwszym autorem, co niewątpliwie świadczy o Jej dużym wkładzie w powstawaniu prac, potwierdzonym oświadczeniami współautorów. Badania, będące podstawą rozprawy doktorskiej, były prowadzone z udziałem znakomitych Badaczy z zagranicznych ośrodków i realizowane w ramach funduszy pochodzących głównie z 3 projektów: Harmonii 9 (środki NCN), ze środków Fundacji Alzheimer's Association NIH oraz Canaletto 2021, a których kierownikiem ze strony polskiej była prof. dr hab. Agnieszka Basta-Kaim, promotor Doktorantki.

Obserwacje ostatnich lat dotyczące znaczenia toczącego się procesu zapalnego w OUN, jako jednego z głównych czynników patogennych w wielu postępujących chorobach neurodegeneracyjnych, takich jak: choroba Alzheimera, choroba Parkinsona, stwardnienie rozsiane czy zaburzenia psychiczne, są niezwykle ważne ze względu na ciągle małą skuteczność terapeutyczną tych schorzeń. Poszukiwanie nowych leków jest możliwe w przypadku udokumentowanej wiedzy na temat toczącego się procesu patologicznego oraz poznania jego mechanizmu. Rozprawa doktorska mgr Kingi Tylek doskonale wpisuje się w tę tematykę.

Rozprawa doktorska mgr Kingi Tylek, napisana w języku polskim, licząca 108 stron jednostronicowego wydruku komputerowego, została bardzo starannie przygotowana. Po zaprezentowaniu strony tytułowej, finansowania badań, podziękowań oraz dedykacji, spisu artykułów będących postawą rozprawy, bardzo przejrzyste przedstawione spisu treści oraz wykazu skrótów, Doktorantka zamieściła streszczenia rozprawy w języku polskim i angielskim. Kolejną część to wprowadzenie do tematyki badań, które powstało na podstawie pierwszego artykułu - pracy przeglądowej oraz przeglądu najnowszego piśmiennictwa, cel pracy, metody i techniki badawcze, wyniki, dyskusja, podsumowanie i wnioski oraz bardzo bogata bibliografia. Do rozprawy doktorskiej zostały dołączone oświadczenia współautorów oraz oryginalne prace w całości stanowiące podstawę rozprawy doktorskiej.

Wprowadzenie do rozprawy doktorskiej jest podzielone na podrozdziały, gdzie mgr Kinga Tylek wykazała się ogromną wiedzą a jednocześnie umiejętnością doboru przydatnych informacji z piśmiennictwa światowego ostatnich lat dla udokumentowania celowości realizowanego tematu. Ponieważ praca przeglądowa jak i trzy następne artykuły oryginalne były już przedmiotem wnikliwych recenzji w publikacjach renomowanych czasopism, a zarazem zawierają ogromną ilość informacji i wyników pozwolę sobie zwrócić uwagę, w mojej opinii, na te najważniejsze jako Recenzenta rozprawy doktorskiej.

Na wstępie Autorka wskazała, że dla prawidłowej homeostazy krótkotrwały proces zapalny jest korzystny, gdyż umożliwia eliminację czynników go indukujących, ale rozwijający się przewlekły stan zapalny może być przyczyną patologii wielu chorób. Mgr Tylek zwróciła tu uwagę na pojawiające się coraz częściej poglądy, że istotą skutecznego wyciszenia niekorzystnego, przewlekłego stanu zapalnego w OUN nie powinno być stosowanie substancji o działaniu immunosupresyjnym tłumiących układ odpornościowy, ale poszukiwanie nowych związków wspierających endogenne mechanizmy wyciszające RoI (z ang. *resolution of inflammation*). A zatem, istotne jest poszukiwanie ligandów i ich receptorów, aby mogły modulować odpowiedź prozapalną w kierunku pro-wyciszeniowej wspierając jednocześnie deficyty endogenne w ograniczaniu reakcji zapalnych. W wyciszeniu reakcji zapalnych duże znaczenie mają endogenne molekuly (ang. *specialized pro-resolving mediators*, SPM), które poprzez interakcje ze specyficznymi receptorami formylowymi, głównie ALX/FPR2, regulują procesy RoI. Jednakże ich niekorzystna farmakokinetyka i biodostępność sprawiają, że bardzo szybko ulegają inaktywacji przez aktywność enzymatyczną komórek w mózgu.

W związku z powyższym, we współpracy z grupą badawczą prof. Lacivita z Katedry Farmacji Uniwersytetu im. Aldo Moro w Bari (Włochy) oraz w oparciu o projekty naukowe realizowane wspólnie z innymi zespołami w Niemczech oraz Stanach Zjednoczonych, zaprojektowano i przeprowadzono syntezę chemiczną nowej grupy mocznikopochodnych związków II generacji m.in. AMS21 czy CMC23 o zadawalających parametrach fizykochemicznych oraz potencjale agonistycznym względem receptora ALX/FPR2, który porównywano z wcześniej zsyntetyzowanym i opracowanym związkiem MR-39 oraz ligandami endogennymi w doświadczalnych modelach immunoaktywacji.

W dalszej części wprowadzenia, Autorka opisuje proces zapalny oraz wpływ różnych elementów układu odpornościowego na homeostazę w OUN, rolę komórek glejowych w procesie zapalnym, i co godne pochwały i dla wygody czytającego, pokazaną dodatkowo, na przejrzystym i kolorowo wykonanym rysunku. Ważnym aspektem jest omówienie wyciszenia procesu zapalnego, gdzie mgr Kinga Tylec koncentruje się na podkreśleniu roli różnych mediatorów a szczególnie wspomnianych – SPM, tj. lipoksyn, którym w tych badaniach poświęcono więcej uwagi. W kolejnych częściach wprowadzenia Doktorantka przybliży: rodzinę receptorów formylowych (FPR), a w szczególności lokalizację i funkcje receptora ALX/FPR2, zmiany konformacyjne oraz stronniczy agonizm pokazany na kolejnym rysunku, a następnie omawia ligandy syntetyczne receptora ALX/FPR2.

Ponadto, mgr Kinga Tylec opisuje doświadczalne modele immunoaktywacji, korzyści wypracowanych modeli przydatnych do dalszych badań, gdzie główną rolę substancji narządowej odgrywa lipopolisacharyd (LPS). Obwodowe podawanie LPS jest najpowszechniej stosowanym modelem doświadczalnym wywołującym uogólniony stan zapalny i zachowania chorobowe (ang. *sickness behaviour*).

Cel pracy został jasno sformułowany i przedstawiony szczegółowo w punktach. Nadrzędnym celem przedstawionych w niniejszej rozprawie badań była weryfikacja hipotezy, że wzmocnienie RoI, poprzez zastosowanie nowych egzogennych ligandów receptora ALX/FPR2 o lepszych parametrach fizykochemicznych oraz efektywnej biodostępności i zadawalającej biodystrybucji może stanowić nową interesującą strategię ograniczającą proces zapalny, przydatną w modulacji deficytów układu odpornościowego w przebiegu wielu chorób OUN.

Bardzo ciekawie zaprezentowany, słusznie skrócony (bo można w szczegółach odnieść się do załączonych w całości artykułów), zarys metodyki prac będących podstawą rozprawy doktorskiej, w postaci schematów i tabel, pozwala szybko i w przejrzysty sposób zapoznać czytającego, jakie procedury, badania analityczne, immunohistochemiczne oraz genetyczne były wykorzystane dla oznaczania przeciwzapalnego i pro-wyciszeniowego potencjału nowych zsyntetyzowanych moczniakopochodnych agonistów receptora ALX/FPR2. Badania te były przeprowadzone w warunkach *in vitro* hodowli pierwotnych mikrogleju, *ex vivo* hodowli organotypowych hipokampa, a następnie weryfikowane w warunkach immunoaktywacji *in vivo* w wybranych strukturach mózgu.

Moim obowiązkiem jako Recenzenta była ocena wszystkich aspektów merytorycznych i interpretacyjnych dysertacji mgr Kingi Tylek. Nie mniej jednak, ponieważ wyniki czterech prac, będących podstawą rozprawy były już wcześniej przedmiotem zapewne wnikliwych recenzji w publikacjach renomowanych czasopism a prace powstawały w znakomitym Zespole Badaczy, pozwolę sobie zwrócić uwagę na niektóre osiągnięcia, które dla przyszłych badań są wysoce aplikacyjne.

Należy podkreślić, że zgromadzono imponującą ilość wyników, których wartość jest szczególnie cenna. Niezmiernie ciekawe jest nowe podejście dla zrozumienia roli aktywacji receptora peptydu formylowego 2 (FPR2), który rozpoznaje szeroką gamę chemicznie zróżnicowanych ligandów endogennych, co stwarza wyjątkową okazję do zmiany profilu aktywacji tego receptora z prozapalnego na przeciwzapalny w mózgu.

W tym aspekcie, badania w organotypowych hodowlach hipokampa (OHC) stymulowanych lipopolisacharydem (LPS) z nowym związkiem, silnym agonistą receptora formylowego, AMS21, sugerują jego korzystne właściwości ochronne i przeciwzapalne w dawkach nanomolarnych, a receptor FPR2 stanowi obiecujący cel dla modulowania niekorzystnych stanów zapalnych. Co więcej, innym interesującym nowo zidentyfikowanym FPR2 agonistą jest CMC23, który wykazał silny ochronny i pro-regenerujący efekt w mechanizmie przeciwzapalnym. Co istotne, w tych badaniach wykazano po raz pierwszy kluczową rolę szlaku regulowanego przez STAT3- w molekularnym mechanizmie przeciwzapalnym CMC23, co pozwala wnioskować, że związek ten może być cennym narzędziem wspierającym endogenne deficyty w tłumieniu reakcji zapalnych.

Dodatkowo, nieopublikowane wyniki badań mgr Kingi Tylek, dotyczyły oceny efektów behawioralnych (test wymuszonego pływania - FST, test Porsolta) oraz immunoenzymatycznych (poziomy białek interleukiny 1 β oraz TNF- α) w strukturach mózgu tj. w hipokampie i korze czołowej, związków: LXA4, MR-39 lub CMC23 podawanych jednostronnie dokomorowo. Plan układu eksperymentalnego *in vivo* przedstawiono na rysunku 4. Wszystkie badania *in vivo* prowadzono na samcach szczurzych z wykorzystaniem zwierzęcego modelu immunoaktywacji z użyciem LPS. Zastosowany w niniejszej pracy test wymuszonego pływania (test Porsolta), modyfikowany we wcześniejszych badaniach Zespołu, wykorzystywany jest powszechnie do badań behawioralnych oraz weryfikacji efektywności badanych związków. W tym miejscu pragnę zwrócić uwagę, że jakkolwiek cennym warsztatem badawczym jest tkanka izolowana dla zbadania pojedynczego efektu, badania behawioralne uzupełnione procedurami molekularnymi są niezwykle pożądane i wnoszą ogromną wiedzę w patomechanizm badanego zaburzenia. W ten sposób, tak zaplanowane badania tworzą kolejną interesującą nową pracę.

Wyniki badań tej części rozprawy, zostały wnikliwie opracowane statystycznie, opisane i przedstawione graficznie na 3 rycinach.

Dyskusja została poprowadzona logicznie i wnikliwie a wyniki zostały właściwie zinterpretowane i skonfrontowane z danymi bibliograficznymi. Zawiera ona również osobiste spostrzeżenia i uwagi dotyczące badań własnych i innych badaczy, co świadczy o dużej wiedzy i rozwadze mgr Kingi Tylek w wyprowadzaniu prawidłowych wniosków. Pewnemu ciekawemu, osobistemu spostrzeżeniu nie mogę się oprzeć i chcę je przytoczyć a które nasunęło się podczas prowadzenia dyskusji przez mgr Kingę Tylek. Ilekroć podczas czytania nasuwało się konkretne zapytanie Recenzenta o interpretację

danego efektu w badaniu, natychmiast w kolejnym zdaniu zawarta była odpowiedź Autorki, zarówno w oparciu o swoje obserwacje i przemyślenia jak i w oparciu o aktualną wiedzę z piśmiennictwa. Takie doświadczenie Recenzenta świadczy jednoznacznie o właściwym przygotowaniu mgr Kingi Tylec do pracy naukowej.

W świetle uzyskanych wyników, Doktorantka prawidłowo sformułowała wnioski. Niektóre osiągnięcia zostały już podkreślone podczas omawiania rozprawy doktorskiej. Nie mniej, bardzo ważnymi, nowatorskimi osiągnięciami Zespołu, w pracach którego brała udział mgr Kinga Tylec było zsyntetyzowanie nowych, moczniopodobnych ligandów receptora ALX/FPR2: związków CMC23 i AMS21, które wykazywały neuroprotektoryjne i pro-wyciszeniowe działanie, a AMS21 również dodatkowo działanie antyoksydacyjne.

Ponadto, wykazano protekcyjne, antyoksydacyjne oraz pro-wyciszeniowe działanie endogennych agonistów receptora ALX/FPR2 związków: LXA4 oraz AT-LXA4, a także egzogenego moczniopochodnego liganda tego receptora – MR-39, którego działanie było dłuższe a mechanizm tego działania związany z hamowaniem tych samych szlaków przekazu sygnału (ERK1/2 oraz NF- κ B), co w przypadku ligandów endogennych (hodowle pierwotne mikrogleju stymulowane lipopolisacharydem-LPS).

Bardzo ważnym efektem było wykazanie największej ekspresji receptora ALX/FPR2 na komórkach mikrogleju, a w mniejszym stopniu także na neuronach i astrocytach (badania ex vivo prowadzone w hodowlach organotypowych hipokampastymulowanych LPS).

Dodatkowo, badania uzupełniające ujawniły deficyty behawioralne (tzw. „sickness behaviour”) w modelu uogólnionej reakcji zapalnej wywołanej jednorazowym dootrzewnowym podaniem lipopolisacharydu u dorosłych szczurów które w teście wymuszonego pływania (test Porsolta) obserwowano jako: wydłużenie czasu bezruchu, skrócenie czasu pływania oraz wspinania. Jednocześnie w hipokampie i korze czołowej zwierząt w modelu immunoaktywacji wykazano wzrost poziomu cytokin prozapalnych IL-1 β oraz TNF- α .

U szczurów po dokomorowym podaniu agonistów receptora ALX/FPR2 (LXA4, CMC23) wykazano normalizację deficytów behawioralnych wywołanych podaniem endotoksyny bakteryjnej, w tym skrócenie czasu bezruchu oraz wydłużenie czasu pływania. Działanie LXA4 było krótkotrwałe w porównaniu do korzystnego efektu związku CMC23, który wydłużał także czas wspinania u szczurów oceniany w teście Porsolta.

Ponadto, w hipokampie oraz korze czołowej dorosłych szczurów wykazano przeciwzapalne działanie agonistów receptora ALX/FPR2. Podwyższony poziom cytokiny prozapalnej TNF- α w hipokampie obniżany był przez wszystkie ligandy (LXA4, MR-39 oraz CMC23), natomiast w korze czołowej zmiany dotyczyły LXA4 oraz CMC23. Jednocześnie wykazano, że podwyższony poziom cytokiny IL-1 β normalizowany był przez moczniopochodne ligandy I i II generacji receptora ALX/FPR2, natomiast LXA4 miała działanie krótkotrwałe.

Podsumowanie zostało bardzo zgrabnie sformułowane przez mgr Kingę Tylec wyręczając tym samym Recenzenta, ale to ponownie świadczy o Jej dojrzałości naukowej i prawidłowym formułowaniu wniosków. W oparciu o przedstawione w rozprawie wyniki badań uzyskane w modelach immunoaktywacji można wnioskować, że receptor ALX/FPR2 poprzez możliwość przyłączania ligandów o różnej budowie chemicznej stanowi niezwykle ważny punkt uchwytu dla nowych związków, które mogą wielokierunkowo modulować odpowiedź zapalną wspomagając proces jej wyciszenia.

Poszukiwanie nowych ligandów receptora ALX/FPR2 o większej aktywności oraz korzystnych parametrach metabolicznych i farmakokinetycznych wydaje się stanowić istotę nowej strategii modulacji procesów zapalnych w ośrodkowym układzie nerwowym, których niekontrolowany oraz przedłużony przebieg stanowi podłoże rozwoju chorób cywilizacyjnych w tym psychicznych i neurodegeneracyjnych.

W świetle tych osiągnięć, bardzo ciekawym i ważnym jest aspekt korzyści dla pacjenta. Moje pytanie dotyczy dalszych badań, m.in. o drogę podania nowych substancji: czy są już badania dotyczące przechodzenia tych substancji przez barierę krew-mózg?- ma to bowiem istotne znaczenie dla stosowania tych substancji w terapii. Zastanawiające jest również czy ingerencja substancji o tak wielokierunkowym efekcie działania w układ odpornościowy nie będzie obciążona dużym ryzykiem działań niepożądanych.

Reasumując, pragnę podkreślić, że badania przeprowadzone przez mgr Kingę Tylec są nowatorskie i bardzo cenne poznawczo. Zaplanowane i przeprowadzone przez Doktorantkę badania w oparciu o nowoczesny warsztat badawczy, są logiczną konsekwencją wytyczonego celu rozprawy i świadczą o Jej właściwym przygotowaniu do pracy naukowej.

Niewielkie błędy edytorskie, literówki oraz wątpliwość czy powinno się używać wyrażenia „zachowań behawioralnych” (str.46 ..”do oceny zachowań behawioralnych”) jako że z ang. behaviour to zachowanie, nie mają żadnego wpływu na końcową ocenę rozprawy.

W podsumowaniu stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr Kingi Tylek pt.” Ocena roli ligandów receptora ALX/FPR2 w wyciszaniu procesów zapalnych w ośrodkowym układzie nerwowym: badania w doświadczalnych modelach immunoaktywacji” spełnia wszystkie kryteria ustawowe stawiane dysertacjom naukowym zgodnie z art.187 ustawy z dn. 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (t. j. Dz. U. 2023, poz 742). W związku z tym wnoszę do Wysokiej Rady Instytutu Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk wnioski 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.

Jednocześnie ze względu na fakt, iż przedstawione w pracy badania są nowatorskie i wnoszą ogromny wkład w poznanie podłoża patologii chorób neurodegeneracyjnych oraz zostały już opublikowane w bardzo dobrych czasopiśmie o wysokiej renomie, a także, że ich synteza jest przedmiotem przygotowywanego międzynarodowego wniosku patentowego, wnoszę o wyróżnienie niniejszej rozprawy doktorskiej.

Katedra i Zakład Farmakologii
Doświadczalnej i Klinicznej
Uniwersytetu Medycznego w Lublinie
Zofia Danilczuk
dr hab. n. med. Zofia Danilczuk