



WARSZAWSKI  
UNIwersytet  
MEDYCZNY

KATEDRA I ZAKŁAD FARMAKOTERAPII I OPIEKI FARMACEUTYCZNEJ

Prof. dr hab. Mariusz Sacharczuk

Warszawa, 6 listopada 2023 r.

Katedra i Zakład Farmakoterapii i Opieki Farmaceutycznej  
Wydział Farmaceutyczny  
Warszawski Uniwersytet Medyczny  
ul. Banacha 1  
02-097 Warszawa

Ocena osiągnięcia naukowego pt.  
„Identyfikacja szlaków molekularnych angażujących receptory estrogenowe oraz  
receptory dla ksenobiotyków w neuroprotekcję i neurotoksyczność”  
zgłoszonego do postępowania habilitacyjnego oraz dorobku naukowego  
doktor nauk medycznych Agnieszki Wnuk  
adiunkta w Pracowni Neurofarmakologii i Epigenetyki, Zakładu Farmakologii  
Instytutu Farmakologii im. Jerzego Maja  
Polskiej Akademii Nauk w Krakowie

W związku z Uchwałą Nr 12/IV/2023 Rady Naukowej IF PAN z dnia 3 października 2023 r. oraz pismem Dyrektora Instytutu Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk, prof. dr hab. Małgorzaty Filip przedstawiam Ocena dotyczącą: osiągnięcia naukowego (I), całokształtu dorobku naukowego (II) oraz osiągnięć w działalności dydaktycznej i organizacyjnej (III) dr n. med. Agnieszki Wnuk, ubiegającej się o stopień doktora habilitowanego w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu, w dyscyplinie nauki medyczne.

Pani dr Agnieszka Wnuk jest absolwentką Zakładu Genetyki i Ewolucjonizmu, Instytutu Zoologii, Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie, który ukończyła w 2012 r., uzyskując tytuł zawodowy magistra biologii (z wyróżnieniem), w specjalizacji genetyka i biologia rozrodu. Pracę magisterską pt. „*Analiza ekspresji*

*genów mOvo1 i mOvo2 u myszy z wodomaciczem i niedrożnością pochwy* wykonała pod kierunkiem dr hab. Małgorzaty Danuty Lenartowicz. W 2013 r. ukończyła studia podyplomowe (z wyróżnieniem) w specjalizacji biologia molekularna na Wydziale Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii, Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie. Od początku swej pracy zawodowej jest związana z Instytutem Farmakologii PAN w Krakowie. Po odbyciu 4-miesięcznego stażu naukowego w 2012 r. została zatrudniona na stanowisku inżynierjno-technicznym w Zakładzie Neuroendokrynologii Doświadczalnej, gdzie pracowała do września 2013 r. W latach 2013-2017 odbyła studia doktoranckie w Zakładzie Neuroendokrynologii Doświadczalnej Instytutu Farmakologii PAN, broniąc w 2018 roku rozprawę doktorską pt. „*The effects of the chemical UV filter - benzophenone-3 in the mouse neuronal cells*” i uzyskując stopień doktora nauk medycznych w dyscyplinie biologia medyczna. Promotorem doktoratu była dr hab. Małgorzata Kajta. W latach 2018-2020 pracowała na stanowisku asystenta w Pracowni Neuroendokrynologii Molekularnej, Zakładu Neuroendokrynologii Doświadczalnej. Od roku 2020 jest adiunktem w Pracowni Neurofarmakologii i Epigenetyki, Zakładu Farmakologii. W 2019 roku przebywała na krótkoterminowym stażu podoktorskim w Instytucie Neuroanatomii Universitätsklinikum RWTH w Akwizgranie.

**I. Ocena osiągnięcia naukowego pt. „*Identyfikacja szlaków molekularnych angażujących receptory estrogenowe oraz receptory dla ksenobiotyków w neuroprotekcję i neurotoksyczność*”.**

Przedstawione do oceny osiągnięcie pt. „*Identyfikacja szlaków molekularnych angażujących receptory estrogenowe oraz receptory dla ksenobiotyków w neuroprotekcję i neurotoksyczność*” stanowi jednotematyczny cykl publikacji poświęconych analizie mechanizmów oddziaływania receptorów estrogenowych oraz receptorów dla ksenobiotyków w procesie neuroprotekcji, neurodegeneracji i neurotoksyczności w modelach *in vitro* procesów związanych z chorobą Alzheimera i niedotlenieniem oraz modelem *in vivo* neurotoksycznego oddziaływaniem ksenobiotyków na OUN płodów mysich. W szczególności Habilitantka scharakteryzowała rolę zmian epigenetycznych w regulacji zmian ekspresji genów wywołanych tymi procesami.

Pięć prac oryginalnych zawartych w przedstawionym do oceny cyklu prac ukazały się w bardzo krótkim okresie czasu, w latach 2020-2021 w czasopismach z listy filadelfijskiej takich jak *Science of the Total Environment*, *Neurotoxicity Research* (2 prace), *Biomedicines* oraz *International Journal of Molecular Sciences*. Cykl obejmuje również pracę przeglądową opublikowaną w *International Journal of Molecular Sciences*, opublikowaną jako ostatnią w 2023 roku. Łączny współczynnik oddziaływania przedstawionych w rozprawie publikacji wynosi 33,025, a łączna punktacja MNiSW wynosi 720. We wszystkich publikacjach oryginalnych i pracy przeglądowej Pani dr Agnieszka Wnuk jest pierwszym autorem. Przedstawiona do oceny dokumentacja składająca się na dorobek naukowy objęty przewodem habilitacyjnym zawiera oświadczenia wszystkich współautorów, którzy wyrazili



zgodę na użycie tych publikacji przez dr Agnieszkę Wnuk w staraniach o habilitację. Oświadczenia te nie budzą zastrzeżeń, gdyż wynika z nich jednoznacznie, że jej udział był wiodący na każdym etapie ich powstawania (od planowania i realizacji doświadczeń po końcowe przygotowywanie manuskryptów).

W pierwszej z cyklu prac oryginalnych, opublikowanej w 2020 r. w prestiżowym czasopiśmie *Science of the Total Environment* (IF = 7.963, obecnie 9.8, MNiSW = 200 pkt), dr Agnieszka Wnuk i wsp. przedstawili wyniki doświadczeń, których celem było zbadanie mechanizmu neurotoksycznego oddziaływania DDE, będącego głównym metabolitem DDT. Badania przeprowadzone w warunkach *in vitro* hodowli komórek kory nowej mózgu myszy wykazały, że oddziaływanie neurotoksyczne DDE związane jest z nasileniem procesu autofagii komórek kory nowej o czym świadczyło podwyższenie poziomu ekspresji markerów tego procesu, w tym *Becn1*, *Map1lc3a/MAP1LC3A*, *Map1lc3bi* *Nup62/NUP62* przy jednoczesnym nasileniu powstawania autofagosomów. Potwierdzeniem otrzymanych wyników było obniżenie poziomu autofagosomów i w konsekwencji zahamowanie autofagii po wyciszeniu kluczowych dla tego procesu czynników, takich jak *Becn1* i *Atg7*. Jest to szczególnie interesujące z uwagi na istotną rolę autofagii w usuwaniu zmienionych konformacyjnie białek, w tym  $\beta$ -amyloidu. Kluczowym w wyjaśnieniu tego interesującego wyniku było udokumentowanie jednoczesnej indukcji procesu apoptozy, zdaniem Autorów, niezbędnej do ostatecznego oddziaływania neurotoksycznego tego ksenobiotyku, co potwierdzono dokumentując zmniejszenie aktywności kaspazy-3 indukowanej przez p,p'-DDE i o,p'-DDE poprzez wyciszenie czynników związanych z autofagią. Oprócz udokumentowania udziału apoptozy i autofagii w neurotoksycznym działaniu DDE, wykazano również kluczową rolę receptorów AHR i CAR w tych procesach, o czym świadczy wzrost ekspresji genów w odpowiedzi na zastosowane izoformy p,p'-DDE i o,p'-DDE. Jednocześnie selektywni antagoniści badanych receptorów, w tym alfa-naftoflawon, CH223191 i CINPA 1, hamowali efekty indukowane przez p,p'-DDE i o,p'-DDE tj. uwalnianie LDH i aktywność kaspazy-3. Ciekawym wynikiem było również wykazanie, że wpływ DDE na ekspresję genów *Ahr*, *Arnt* i *Car* był izomerozależny na poziomie mRNA, tj. o,p'-DDE zmieniało wyłącznie poziom mRNA dla *Car* natomiast p,p'-DDE zmieniało ekspresję wszystkich badanych genów, przy braku takiej specyficzności na poziomie białka. Powyższe wyniki są o tyle interesujące, że oprócz niewątpliwego wkładu w poznanie mechanizmu neurotoksycznego oddziaływania DDE, mogą pozwolić na lepsze zrozumienie procesów prowadzących do rozwoju chorób neurodegeneracyjnych związanych z odkładaniem depozytów nierozpuszczalnych, zmienionych konformacyjnie białek.

W kolejnej współautorskiej pracy, opublikowanej w 2021 r. w *International Journal of Molecular Sciences* (IF = 6,208; MNiSW = 140 pkt) Habilitantka wykorzystwała model *in vitro* mózgu 1-miesięcznych myszy, których matki poddawane były oddziaływaniu triklokarbanu. W pracy zbadano zatem oddziaływanie tego związku na procesy rozwojowe OUN w okresie prenatalnym. Szczególnie interesującym i godnym uwagi było potwierdzenie hamowania przez triklokarban ekspresji receptorów ESR1, zarówno na poziomie mRNA jak i białka



w korze mózgowej, który to mechanizm oddziaływania stwierdzono wcześniej w modelu *in vitro* hodowli pierwotnej neuronów. Hamowanie ekspresji związane było z hipermetylacją *Esr1* zarówno w warunkach *in vitro* jak i *in vivo* oraz było niezależne od płci. Szczególnie ważnym podkreślenia jest fakt, że wyniki z badań *in vivo* nie potwierdziły zmian w ekspresji genów w odpowiedzi na triklokarban związanych z procesami autofagii i apoptozy, które stwierdzono wcześniej w badaniach *in vitro* (Kajta i wsp. 2019,2020), co jest kolejnym dowodem na częsty brak uniwersalizmu wpływu substancji na komórki w obu tych, jakże odmiennych warunkach (*in vitro vs. in vivo*). Kandydatka zwróciła natomiast uwagę, że jednym z najistotniejszych wyników opublikowanych w omawianej pracy dotyczy zależnej od płci zmian ekspresji genów związanych z procesami neurogenezy i neuroprzekaznictwa jak również globalnego wzoru metylacji. Jest to moim zdaniem o tyle istotne, iż może być związane z różną częstością występowania zaburzeń neurorozwojowych, zależnie od płci u człowieka a będących konsekwencją odmiennej wrażliwości na substancje neurotoksyczne, w tym triklokarban, który jak potwierdziła Habilitantka ma bardzo dobrą przenikalność przez barierę krew-mózg.

Kolejne trzy prace objęte cyklem dotyczyły badań *in vitro* potencjału neuroprotekcijnego dwóch związków tj. PaPE-1 i amorfrutyny B w odniesieniu do modelu *in vitro* choroby Alzheimera (PaPE-1) oraz ischemii (PaPE-1 i amorfrutyna B). Wszystkie doświadczenia zostały wykonane z użyciem hodowli komórek kory nowej mózgu myszy.

Pierwsza z tych prac, opublikowana w *Neurotoxicity Research* (IF = 3,911; MNiSW = 70 pkt) dotyczy badań związanych z oceną możliwości obniżenia wrażliwości na neurotoksyczne oddziaływanie  $\beta$ -amyloidu komórek kory nowej przez selektywnego agonistę błonowych receptorów estrogenowych mER $\alpha$  i mER $\beta$ , tj. PaPE-1. Agonista ten poprzez marginalne oddziaływanie z receptorami estrogenowymi związanymi z białkami G i całkowity brak agonizmu estrogenowych receptorów jądrowych a także poprzez charakterystyczny profil farmakokinetyczny pozbawiony jest szeregu działań niepożądanych. Ponadto, PaPE-1 charakteryzuje się korzystnym profilem oddziaływania również w innych aspektach, tj. nie oddziałuje w sposób typowy dla estradiolu na macicę, gruczoł mleczny i grasicę, ale ściśle naśladuje działanie estradiolu w tkankach metabolicznych i naczyniowych redukując tkankę tłuszczową, obniżając stężenie trójglicerydów we krwi oraz odbudowując śródbłonek naczyniowy, zmniejsza poziom stłuszczenia wątroby w mysich modelach otyłości, a także co jest bardzo istotne z punktu widzenia neuroprotekcijnego działa ochronnie na barierę krew-mózg obniżając przedostawanie się limfocytów do mózgu w modelu udaru niedokrwienego MCAO zmniejszając tym samym odczyn zapalny w obrębie mózgu. W badaniach własnych objętych omawianą pracą, Habilitantka wykazała, że w wyniku 24-godzinnej ekspozycji, PaPE-1 (5  $\mu$ M) hamował efekty wywołane przez  $\beta$ -amyloid, o czym świadczą zmniejszone parametry neurotoksyczności i apoptozy szlaku wewnętrznego obejmujące obniżenie aktywności kaspazy-3, LDH i stężenia ROS, normalizację potencjału błony mitochondrialnej, poprawę żywotności komórek



oraz normalizację ekspresji białek proapoptotycznych do antyapoptotycznych (BAX/BCL2). Habilitantka wnioskuje, że neuroprotektoryjne właściwości PaPE-1 wynikają głównie z hamowania mitochondrialnego szlaku apoptotycznego. Należy jednak zwrócić uwagę, że w modelu *in vitro* kory nowej stosowanej przez Autorów zbadanie szlaku zewnętrznego (receptorowego) oraz pseudoreceptorowego jest wręcz niemożliwe. Ponadto definiowanie hodowli komórek w środowisku  $\beta$ -amyloidu jako modelu choroby Alzheimera jest co najmniej kontrowersyjne. Aktualnie Habilitantka, w ramach zespołu Pani prof. Małgorzaty Kajty, kontynuuje badania nad neuroprotektoryjnym oddziaływaniem PaPE-1, które tym razem obejmują mysie modele choroby Alzheimera, w większym stopniu odwzorowujące tak złożony patomechanizm tej choroby. Niewątpliwie, wnioskowanie oparte na wynikach z badań *in vitro* jak i *in vivo* mogą mieć duży potencjał poznawczy jak i aplikacyjny w kontekście możliwej terapii AD z wykorzystaniem PaPE-1.

Kolejna praca, również opublikowana w *Neurotoxicity Research* (2021 r.; IF = 3,978; MNiSW = 70 pkt) dotyczyła oddziaływania neuroprotektoryjnego PaPE-1, ale tym razem w odniesieniu do modelu hipoksji, tj. bardzo ważnego aspektu kliniczno-społecznego. Udary mózgu, szczególnie niedokrwienne, są bowiem najczęstszą przyczyną niepełnosprawności na świecie, co spowodowane jest brakiem skutecznej farmakoterapii o szerokim, czasowym oknie terapeutycznym i wysokim potencjale bezpieczeństwa. W badaniach przeprowadzonych *in vitro* ponownie wykorzystano pierwotne hodowle komórek kory nowej mózgu myszy, które w 7 dniu hodowli poddano warunkom hipoksji i/lub ischemii. Stosując testy LDH, Fluoro-Jade C oraz czerwieni obojętnej Habilitantka i wsp. stwierdzili, że PaPE-1 hamuje neurotoksyczność i neurodegenerację indukowaną hipoksją i ischemią. Na neuroprotektoryjne właściwości PaPE-1 składało się również zmniejszenie syntezy ROS i przywrócenie komórkowej aktywności metabolicznej oraz hamowanie procesu apoptozy przejawiające się normalizacją zarówno potencjału błony mitochondrialnej, jak i poziomu ekspresji genów i białek związanych z apoptozą. Ważnym podkreślenia było 6-godzinne opóźnienie we wprowadzeniu do hodowli PaPE-1, co przynajmniej teoretycznie imituje dość szerokie czasowo okno terapeutyczne. Jeszcze raz należy jednak podkreślić że efekt tak późnego włączenia badanego związku należy zweryfikować w badaniach *in vivo*, ponieważ efekty czasu mogą znacznie różnić się pomiędzy tymi tak odmiennymi warunkami życia komórek i warunków środowiska pozakomórkowego. Pani dr Agnieszka Wnuk prowadzi aktualnie tego typu badania w ramach kierowanego przez nią projektu NCN SONATA-17, co świadczy o jej konsekwentnej pracy naukowej mającej na celu kompleksowe zbadanie mechanizmów oddziaływań neuroprotektoryjnych czy neurodegeneracyjnych badanych związków.

Ostatnia z prac mająca na celu wyłonić i zbadać mechanizmy oddziaływania neuroprotektoryjnego różnych związków została opublikowana w 2021 r. w czasopiśmie *Biomedicines* (IF = 4,757; MNiSW = 100 pkt). W pracy, wykorzystując analogiczny model *in vitro* hipoksji komórek kory nowej przeprowadzono ocenę możliwości wykorzystania selektywnej modulacji receptorów PPAR $\gamma$  w neuroprotekcji i hamowaniu zmian wywołanych



niedotlenieniem komórek. Podjęta problematyka jest niezmiernie istotna i interesująca z punktu widzenia klinicznego, bowiem dotychczasowe próby modyfikacji tych receptorów przy wykorzystaniu pełnych ich agonistów, m.in. leków z grupy TZD nie przyniosła oczekiwanych rezultatów, m.in. z powodu ich licznych działań niepożądanych. Habilitantka w swoich badaniach przeprowadziła ocenę amorfrutyny B, należącej do grupy związków o charakterze SPPAR $\gamma$ M, jako potencjalnego leku mogącego mieć zastosowanie w klinicyście leczenia udarów, a dotychczas poznanego jako oddziałującego korzystnie na gospodarkę lipidowo-węglowodanową oraz posiadającego właściwości przeciwbakteryjne i przeciwzapalne, a jednocześnie niewykazującego działań niepożądanych charakterystycznych dla TZD. Stosując ten sam punkt czasowy wprowadzenia do środowiska komórek, co w przypadku PaPE-1, tj. 6 godzin od wywołania hipoksji wykazała istotne oddziaływanie neuroprotektoryjne, które zostało potwierdzone poprzez zniesienie tego efektu po zastosowaniu antagonisty receptorów PPAR $\gamma$ . Również w tym przypadku badania nad neuroprotektoryjnymi właściwościami amorfrutyny B są kontynuowane przez Habilitantkę w ramach grantu NCN OPUS 16, kierowanego przez prof. Małgorzatę Kajta,

W skład publikacji stanowiących podstawę osiągnięcia naukowego wchodzi również praca przeglądowa pt. „*Emerging evidence on membrane estrogen receptors as novel therapeutic targets for central nervous system pathologies*” wydana jako ostatnia praca z cyklu w 2023 r. w czasopiśmie *International Journal of Molecular Sciences* (IF = 6,208; MNiSW = 140 pkt), która podsumowuje zasadność naukową i możliwości terapeutyczne zastosowania selektywnej stymulacji błonowych receptorów estrogenowych w terapii chorób OUN. Praca jest bardzo wartościową pozycją w obszarze nie tylko tematyki, którą zajmuje się Habilitantka, ale również szeroko rozumianej neurobiologii. Publikacja ta jest jednocześnie dowodem dogłębnej znajomości tematyki podjętej we wniosku o nadanie stopnia doktora habilitowanego.

Przedstawiony cykl publikacji, stanowiący osiągnięcie naukowe został uzupełniony autoreferatem zawierającym wprowadzenie do problematyki szlaków molekularnych angażujących receptory estrogenowe oraz receptory dla ksenobiotyków w neuroprotekcję i neurotoksyczność a także etiologii i potencjalnych szlaków terapeutycznych w leczeniu niedokrwiennego udaru mózgu, niedotlenienia okołoporodowego i choroby Alzheimera. Następnie Habilitantka omówiła w sposób syntetyczny cele podjętych badań, zastosowaną metodykę oraz opis uzyskanych wyników wraz z wnioskami. Całość zamyka bibliografia licząca 101 dobrze dobranych pozycji literatury. W strukturze Autoreferatu brakuje mi natomiast wyraźnie zdefiniowanej hipotezy badawczej, którą Habilitantka weryfikowała w toku prowadzonych doświadczeń.

**Znaczenie podjętej problematyki:** Postępujące zmiany demograficzne w Polsce i na świecie związane ze starzeniem się społeczeństwa jednoznacznie wskazują że badania dotyczące procesów patologicznych związanych z wiekiem wydają się wręcz priorytetowe, tym bardziej że są to jednostki chorobowe o niepoznanej



dotychczas etiologii i mechanizmach przebiegu a w związku z tym ograniczoną możliwością leczenia przyczynowego, szczególnie w odniesieniu do choroby Alzheimera. Skuteczność postępowania terapeutycznego w udarach niedokrwiennych czy niedotlenieniu okołoporodowym jest również bardzo ograniczona nie tylko pod względem skuteczności i działań niepożądanych dostępnych leków czy innych metod terapeutycznych, ale również czasowym. Bardzo ważnym aspektem jest również obniżanie się wieku występowania udarów niedokrwiennych ale także wzrost częstości przypadków niedotlenienia okołoporodowego, co może być w tym przypadku związane z podwyższaniem się wieku kobiet planujących ciążę. Wzrost zachorowań w odniesieniu do wspomnianych jednostek chorobowych to nie tylko problem dotyczący samego pacjenta, ale również problem ekonomiczny i socjalny społeczeństwa. Podjęta przez dr Agnieszkę Wnuk badania dotyczące poznania nowych mechanizmów badanych chorób oraz ocena możliwości wdrożenia nowych metod terapeutycznych, głównie z wykorzystaniem agonistów błonowych receptorów estrogenowych wpisuje się zatem w obszar badań o szczególnym znaczeniu zarówno dla medycyny jak i społeczeństwa.

**Dobór modelu badawczego i metodyki:** Prawidłowość zaplanowania odpowiednich procedur badawczych jest warunkiem niezbędnym do otrzymania wyników pozwalających zweryfikować postawione hipotezy. Badania zaplanowane przez Habilitantkę wymagały szerokiej wiedzy i umiejętności zarówno z zakresu neurobiologii, farmakologii jak i genetyki molekularnej. Przeprowadzone doświadczenia były również niezwykle złożone i czasochłonne, zatem niezbędna była również ponadprzeciętna zdolność organizacji pracy i poświęcenia, w czym zapewne pomogła świetna organizacja w Pracowni Neurofarmakologii i Epigenetyki pod kierunkiem prof. dr hab. Małgorzaty Kajta.

Prawidłowość zastosowanych związków poddanych ocenie ich działania, tj. PaPE-1 czy amorfrutyny B zastosowanych przeciwciał, ich stężeń etc. nie budzą moich wątpliwości.

Otrzymane przez Habilitantkę i wsp. wyniki uzyskano głównie w modelu *in vitro* komórek kory nowej mózgu myszy. Obecnie duża część badań toksykologicznych, w szczególności ze względów etycznych i proceduralnych, prowadzona jest *in vitro* na komórkach i można przypuszczać, że otrzymane wyniki byłyby zbieżne z otrzymanymi w drodze *in vivo*. Ostrożniejsze wnioskowanie dotyczy natomiast badań potencjalnego efektu terapeutycznego badanych związków w warunkach *in vitro*, bowiem znane są bardzo liczne przykłady braku potwierdzenia wyników (zarówno fałszywie pozytywnych jak i fałszywie negatywnych) do tych wykonanych w warunkach *in vivo* z wykorzystaniem zwierząt modelowych, a już tym bardziej ich skuteczności terapeutycznej w klinicyście człowieka, dlatego wnioskowanie o potencjalnej translacyjności otrzymanych wyników powinno być co najmniej bardzo ostrożne.

Złożoność OUN, interakcji pomiędzy poszczególnymi typami komórek i udziału bariery krew-mózg nie tylko w kontekście jej przepuszczalności ale również



możliwości aktywnego usuwania różnych związków powinna tym bardziej zwiększyć czujność we wnioskowaniu otrzymanych wyników z badań *in vitro*. Komórki w warunkach *in vitro* wykazują znacznie mniejszą wrażliwość na neurotoksyny czy substancje neuroprotektyjne niż komórki badane *in vivo* w tkankach zwierząt. Co więcej, w hodowli *in vitro* komórki nie są zsynchronizowane i nie wszystkie mają markery charakterystyczne dla dojrzałych neuronów. Czynniki te sprawiają, że mimo iż komórki kory nowej czy innych struktur mózgu są powszechnie wykorzystywane jako model *in vitro* w badaniach schorzeń układu nerwowego, mogą się pojawić pewne wątpliwości przy interpretacji otrzymanych wyników. Ponadto dwuwymiarowe (2D) hodowle komórek *in vitro* nie odzwierciedlają mikrośrodowiska tkanki i są coraz częściej zastępowane przez hodowle trójwymiarowe (3D).

Obecnie Habilitantka kontynuuje swoje badania w ramach projektów OPUS i SONATA m.in. z wykorzystaniem modeli zwierzęcych, co niewątpliwie może wpłynąć nie tylko na dalsze poznanie badanych mechanizmów, ale zwiększy ich potencjał aplikacyjny. Moje uwagi nie mają zatem charakteru krytyki, lecz dyskusji z Kandydatką odnośnie możliwości jednoznacznego wnioskowania z uzyskanych wyników dotyczących badań z wykorzystaniem wyłącznie modeli *in vitro* czy też nawet definiowania ich jako modeli choroby Alzheimera, udaru niedokrwinnego jak również niedotlenienia okołoporodowego. Wszystkie te procesy patologiczne są tak złożone, że modele *in vitro* jedynie w niewielkim stopniu obrazują ich rzeczywisty przebieg.

W odniesieniu do modelu *in vivo* oddziaływania triklokarbanu na płody myszy doświadczenie przeprowadzono podając ten ksenobiotyk samicom od 15 do 18 dnia ciąży a więc w ostatnich dniach przed porodem. Moim zdaniem chcąc zbadać wpływ tego i innych ksenobiotyków na procesy neurorozwojowe OUN płodów (co było celem przeprowadzonych badań) należałoby zastosować dodatkową lub dodatkowe grupy badawcze na wcześniejszym etapie rozwoju płodu, kiedy procesy kształtowania OUN są szczególnie intensywne, co przypuszczam jest zaplanowane lub realizowane w ramach prowadzonego przez Kandydatkę grantu SONATA.

**Podsumowując, za najważniejsze wyniki uzyskane w cyklu publikacyjnym uważam:**

1. Wykazanie, że modulacja błonowych receptorów estrogenowych jest efektywniejsza i korzystniejsza terapeutycznie oraz pozbawiona efektów niepożądanych które związane są z innymi typami receptorów estrogenowych, w tym jądrowych i związanych z białkiem G

2. Wykazanie neuroprotektynnego oddziaływania selektywnego aktywatora błonowych receptorów estrogenowych (mER $\alpha$ , mER $\beta$ )-PaPE-1 w modelu *in vitro* niedotlenienia okołoporodowego, udaru niedokrwinnego mózgu i neurotoksycznego oddziaływania  $\beta$ -amyloidu oraz wyjaśnienie mechanizmu takiego oddziaływania poprzez hamowanie stresu oksydacyjnego, nekrozy i apoptozy, zwłaszcza związanej ze szlakiem mitochondrialnym.



3. Wykazanie potencjału neuroprotektynowego amorfutyny B modulującej selektywnie receptory PPAR $\gamma$  w korzystnym czasowo oknie terapeutycznym w modelu niedotlenia *in vitro* komórek kory nowej myszy oraz mechanizmu takiego oddziaływania poprzez wybiórczą modyfikację poziomu metylacji promotora tego genu

4. Wykazanie mechanizmu neurotoksycznego oddziaływania triklokarbanu i DDE na komórki OUN płodu myszy poprzez rozregulowanie procesu autofagii i udział w tym procesie szlaków związanych z receptorami estrogenowymi i receptorami dla ksenobiotyków oraz zmianami epigenetycznymi komórek nerwowych mózgu

5. Wykazanie, iż prenatalny efekt triklokarbanu na zmiany poziomu i wzoru globalnej metylacji DNA zależny jest od płci

**W podsumowaniu oceny stwierdzam, że osiągnięcie naukowe dr Agnieszki Wnuk stanowi znaczny wkład w rozwój dyscypliny nauki medycznej, w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu**

## **II. Ocena dorobku naukowego**

Całkowity dorobek publikacyjny dr Agnieszki Wnuk (po wyłączeniu zgodnie z obowiązującymi przepisami prac wchodzących w skład ocenianego wyżej osiągnięcia naukowego) w chwili składania ocenianego wniosku obejmował 23 prace oryginalne i 2 prace poglądowe, w istotnej części przygotowane z kluczowym udziałem Kandydatki (w 8 była pierwszym autorem). Wprawdzie Kandydatka w żadnej z prac nie jest autorem ostatnim, co świadczyłoby o kierowaniu zespołem badawczym, ale jest to niewątpliwie kwestia niedługiej perspektywy z uwagi na pełnione obecnie kierownictwo projektu NCN SONATA. Sumaryczny IF tych prac był bliski 106 a łączna punktacja MNiSW wyniosła 1590. Prace cytowane były łącznie 499 razy (bez autocytowań), co przełożyło się na wysoki (jak na ten etap rozwoju naukowego) współczynnik Hirscha wynoszący 18.

Do innych publikacyjnych osiągnięć naukowych Kandydatki należą 3 prezentacje ustne na konferencjach krajowych i międzynarodowych; 65 komunikatów i referatów konferencyjnych prezentowanych w kraju i za granicą oraz 6 wykładów na seminariach krajowych. Kandydatka brała też czynny udział w wydarzeniach popularyzujących naukę wygłaszając 5 prezentacji o charakterze popularnonaukowym.

Dr Agnieszka Wnuk była kierownikiem jednego projektu badawczego NCN PRELUDIUM 7 i jest obecnie kierownikiem kolejnego, uzyskanego w ramach NCN SONATA. Ponadto Kandydatka jest wykonawcą realizowanych 4 projektów badawczych, w tym trzech finansowanych przez NCN i jednego finansowanego przez Uniwersytet w Haifie (Izrael). Ponadto była wykonawcą w 9 zakończonych



projektach badawczych. Duża aktywność projektowa Kandydatki świadczy o jej umiejętności w pozyskiwaniu funduszy na badania oraz rozpoznawalności w środowisku naukowym.

Pani dr Agnieszka Wnuk jest również od 2019 r. członkiem Polskiego Towarzystwa Badań Układu Nerwowego; pełniła też taką funkcję (2016-2021) w European Society of Toxicology In Vitro – ESTIV.

Bardzo ważnym w rozwoju naukowym Kandydatki, świadczącym o jej mobilności i możliwości nawiązywania współpracy, były również odbyte, głównie 1-miesięczne, staże zagraniczne, m.in. na Uniwersytecie w Perpignan (Francja, 2021 r.), Instytucie Neuroanatomii Universitätsklinikum RWTH w Akwizgranie (2019) w ramach stypendium wyjazdowego Fundacji na Rzecz Nauki Polskiej, Uniwersytecie w Zurychu (2017 r.) w ramach funduszy KNOW jak również krajowy staż w Katedrze Biotechnologii Zwierząt Uniwersytetu Rolniczego w Krakowie (październik/listopad 2015).

Habilitantka jest również członkiem Rad Recenzentów uznanych czasopism takich jak: *International Journal of Molecular Sciences*, *Antioxidants*, *Symmetry*, *Proteomes*, wykonując dotychczas ponad 140 recenzji dla wymienionych i innych prestiżowych czasopism.

Osiągnięcia naukowe Kandydatki zostały również docenione w obszarze praktycznym poprzez wykorzystanie jej prac w raportach m.in. międzynarodowej agencji Human Biomonitoring For Europe (HBM4EU) i Komisji Europejskiej (Wnuk i wsp. 2019, *Mol. Neurobiol.* 56(7):4820-4837), raporcie Panelu Ekspertów ds. Bezpieczeństwa Składników Kosmetycznych powstałym przy wsparciu FDA (Wnuk i wsp. 2018, *Mol Neurobiol.* 55(3):2362-2383), raporcie międzynarodowej organizacji OECD - Organizacji Współpracy Gospodarczej i Rozwoju, mającej wpływ na politykę środowiskową świata (Wnuk i wsp. 2016, *Neurotox Res.* 29(1):155-72), we wspólnym raporcie Komisji Europejskiej - European Chemical Agency (ECHA) oraz Francuskiej Agencji ds. Żywności, Środowiska oraz Bezpieczeństwa i Higieny Pracy (ANSES) (Kajta i wsp. 2019, *Mol Neurobiol.* 56(5):3113-3131 oraz Kajta i wsp. 2010, *Sci Total Environ.* 701:134818).

W uznaniu osiągnięć naukowych Kandydatka uzyskała 6 nagród Dyrektora Instytutu Farmakologii za publikacje naukowe w latach 2018, 2020, 2021 oraz Zespołową Nagrodę Naukową Wydziału Nauk Medycznych Polskiej Akademii Nauk za cykl publikacji pt. Identyfikacja nowych mechanizmów molekularnych angażujących receptory estrogenowe i receptory dla ksenobiotyków w neuroprotekcję i neurotoksyczność. (listopad 2018).

Ważnym podkreślenia jest prowadzenie przez Kandydatkę licznych współprac naukowych ze znanymi ośrodkami zagranicznymi jak i krajowymi, m.in. z prof. Cordian Beyer z Instytutu Neuroanatomii, RWTH Aachen University, prof. Inna Gaisler-Salomon z Uniwersytetu w Haifie, prof. dr hab. Joanną Śliwowska z Pracowni Neurobiologii, Instytutu Zoologii Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu, dr hab. Małgorzatą Lenartowicz z Instytutu Zoologii i Badań Biomedycznych Uniwersytetu



Jagiellońskiego w Krakowie, prof. dr hab. Elżbietą Salińską z Zakładu Neurochemii Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im M. Mossakowskiego PAN w Warszawie, prof. dr hab. Anną K. Wójtowicz oraz dr hab. Konradem Szychowskim z Katedry Biotechnologii Zwierząt Uniwersytetu Rolniczego im. H. Kołłątaja w Krakowie. Współpraca dotyczy również wspólnych badań z innymi zespołami macierzystej jednostki IF PAN w Krakowie, w tym z prof. dr hab. Krystyną Gołembiewską oraz dr Karoliną Noworyta z Zespołu II Zakładu Farmakologii czy dr hab. Elżbietą Lorenc-Koci z Zakładu Neuropsychofarmakologii.

**Podsumowując tę część oceny mogę stwierdzić:**

**Habilitantka posiada istotny dorobek naukowy, przekraczający wymagania ustawowe, niezbędne dla uzyskania stopnia doktora habilitowanego.**

### **III. Ocena działalności dydaktycznej**

W kwestii działalności dydaktycznej dorobek Kandydatki również nie budzi żadnych moich zastrzeżeń. Pani Dr Agnieszka Wnuk jest pracownikiem naukowym w instytucie PAN, co z założenia i powołania takiej jednostki związane jest głównie z prowadzeniem badań naukowych. Pomimo ogromnego zaangażowania w pracę naukową Habilitantka również na tym polu ma szereg osiągnięć, głównie w postaci promotorstwa w przewodach doktorskich ale również magisterskich i licencjackich, a więc związanych także z kształceniem akademickim. Do chwili złożenia wniosku o nadanie stopnia dra habilitowanego Kandydatka była promotorem obronionej jednej pracy magisterskiej oraz dwu prac licencjackich. Jest również promotorem pomocniczym w dwu otwartych przewodach doktorskich. Była również organizatorem 2 staży doktorantów z RWTH Aachen, Niemcy w ramach „Międzynarodowej wymiany stypendialnej kadry akademickiej i doktorantów PROM”. Do działalności dydaktycznej Kandydatki można również zaliczyć prowadzenie od 2017 r. spotkań naukowych organizowanych przez Dyрекcję IF PAN w Krakowie, przeznaczonych dla doktorantów i młodych naukowców (Koordynator Journal Club) a także liczne wykłady m.in. na organizowanych w Krakowie Festiwalach Nauki i Sztuki. Udzieliła również wywiadu dla Forum Akademickiego.

### **Wnioski końcowe**

Doktor nauk medycznych Agnieszka Wnuk jest doświadczonym pracownikiem naukowym. Zainteresowania naukowe Habilitantki są szerokie, lecz obecnie koncentrują się na neurobiologii, w tym szczególnie na procesach neurodegeneracyjnych i możliwościach oddziaływania neuroprotektynowego poprzez błonowe receptory estrogenowe w różnych modelach chorób związanych z uszkodzeniem OUN. Prace naukowe nad tymi zagadnieniami prowadzone są przez Habilitantkę od 10 lat i związane są z działalnością naukową w Pracowni Neurofarmakologii i Epigenetyki, Zakładu Farmakologii IF PAN w Krakowie.



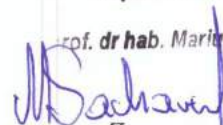
Przedstawione do oceny osiągnięcie naukowe, które stanowi cykl pięciu prac oryginalnych i jednej przeglądowej, powiązanych tematycznie uważam za bardzo interesujące i wartościowe. Publikacje te stanowią istotny wkład w poznanie mechanizmów rozwoju neurodegeneracji związanej z niedotlenieniem, chorobami zwyrodnieniowymi czy oddziaływaniem ksenobiotyków, co jest warunkiem możliwości wprowadzenia nowych skuteczniejszych form terapii. Należy podkreślić, że wskaźnik dokonań naukowych Habilitantki w odniesieniu do przedstawionego do oceny cyklu prac jak i całokształtu dorobku naukowego jest bardzo wysoki o czym świadczy ranga czasopism w których publikowane są prace, liczba cytowań i wynikający z nich wysoki współczynnik Hirscha.

W podsumowaniu recenzji stwierdzam, że dorobek naukowy, dydaktyczny i organizatorski Kandydatki spełnia wszystkie wymagania stawiane osobom ubiegającym się o stopień naukowy doktora habilitowanego.

Wnoszę zatem do Rady Naukowej Instytutu Farmakologii PAN w Krakowie o dalsze procedowanie postępowania w sprawie nadania stopnia doktora habilitowanego w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu, dyscyplinie nauki medyczne dr Agnieszki Wnuk.

PROFESOR  
Katedry i Zakładu Farmakoterapii  
i Opieki Farmaceutycznej

prof. dr hab. Mariusz Sacharczuk



Z wyrazami szacunku