

Prof. dr hab. Dariusz Rakus

Wrocław, 13.01.2026

Zakład Fizjologii i Neurobiologii Molekularnej

Uniwersytet Wrocławski

ul. Sienkiewicza 21

50-335 Wrocław

Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr Bernadety Pietrzak-Wawrzyńskiej pt.

„Inicjowana pozajądrowo sygnalizacja receptorów estrogenowych jako nowy punkt uchwytu terapii neuroprotektoryjnych: identyfikacja molekularnych mechanizmów

działania PaPE-1 w hodowlach pierwotnych neuronów oraz komórek mikrogleju linii

HMC3 narażonych na A β ” wykonanej w Instytucie Farmakologii im. Jerzego Maja

Polskiej Akademii Nauk pod kierunkiem prof. dr hab. Małgorzaty Kajty – promotor i dr

hab. Agnieszki Wnuk – promotor pomocniczy.

Rozprawa doktorska Pani mgr Bernadety Pietrzak-Wawrzyńskiej została przygotowana w Instytucie Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk w Krakowie (w Pracowni Neurofarmakologii i Epigenetyki Zakładu Farmakologii Uzależnień) pod kierunkiem prof. dr hab. Małgorzaty Kajty; promotorem pomocniczym była dr hab. Agnieszka Wnuk. Rozprawa ma charakter hybrydowy i obejmuje zwięzłe omówienie dwóch publikacji doświadczalnych (*Molecular Neurobiology*, 2024; *Journal of Molecular Biology*, 2025) oraz część opisową, będącą wprowadzeniem do zagadnienia oraz porządkującą kontekst, metodykę badań i wnioski.

Tematyka pracy dotyczy mechanizmów neuroprotekcji w kontekście choroby Alzheimera (AD) oraz możliwości farmakologicznego wykorzystania pozajądrowej, niejądrowej sygnalizacji receptorów estrogenowych ESR1/ESR2 z zastosowaniem liganda PaPE-1 (Pathway Preferential Estrogen). Jest to zagadnienie aktualne i ważne zarówno poznawczo, jak i potencjalnie aplikacyjnie. W świetle danych wskazujących na większą częstość zachorowań na AD u kobiet, a także na neuroprotektoryjny potencjał estrogenów, który jest jednakże ograniczany przez działania uboczne związane z aktywacją szlaków jądrowych, koncepcja selektywnego przetęczenia sygnalizacji estrogenowej na komponent wyłącznie pozajądrowy jest dobrze uzasadniona.

Celem badań było sprawdzenie, czy PaPE-1 może odwracać (a nie jedynie zapobiegać) skutkom toksyczności amyloidu beta ($A\beta$) w paradygmacie leczenia odroczonego w czasie, oraz identyfikacja mechanizmów molekularnych tej ochrony, w szczególności w zakresie: apoptozy, autofagii, zmian epigenetycznych oraz neurozapalenia. Tak sformułowane cele są spójne i odpowiadają współczesnemu rozumieniu wieloczynnikowości patologii AD.

Rozprawa jest logicznie zbudowana. Wstęp stanowi czytelne wprowadzenie do patogenezy AD oraz do biologii receptorów estrogenowych i preferencyjnej sygnalizacji PaPE-1. Część metodologiczna jest wystarczająco szczegółowa, a autorka dodatkowo porządkuje zastosowane techniki w tabelach zestawiających metody z badanymi parametrami. Na uznanie zasługuje również konsekwentne utrzymanie jednego, klinicznie bardziej realistycznego schematu doświadczeń (post-treatment) w dwóch komplementarnych modelach komórkowych.

W części doświadczalnej wykorzystano pierwotne mysie hodowle neuronalne oraz ludzką linię mikrogleju HMC3. Analizy obejmowały m.in. ocenę neurodegeneracji i sieci neurytów, aktywność kaspaz, markery autofagii, ekspresję receptorów estrogenowych (z uwzględnieniem frakcji błonowej), metylację DNA wybranych promotorów, aktywność enzymów HAT/HDAC, oraz wybrane markery zapalne (kaspaza-1, ATP pozakomórkowe, $IL1\beta$, NLRP3). Dobór metod jest adekwatny i pozwala na dogłębną interpretację badanych zjawisk.

Najmocniejszą stroną rozprawy jest pokazanie, że PaPE-1 wykazuje działanie ochronne w warunkach leczenia odroczonego, co zwiększa wiarygodność translacyjną w porównaniu z klasycznymi schematami profilaktycznymi. Pani mgr Bernadeta Pietrzak-Wawrzyńska Autorka wykazała, że w neuronach $A\beta$ indukuje neurodegenerację oraz aktywuje apoptozę (wzrost aktywności kaspaz i ekspresji czynników proapoptotycznych), a PaPE-1 częściowo odwraca te efekty. Równolegle PaPE-1 obniża ekspresję genów powiązanych z patologią AD (m.in. App, Bace2, Apoe) oraz zwiększa ekspresję Chat, co jest interesujące w kontekście wątku cholinergicznego w AD.

Pani mgr Bernadeta Pietrzak-Wawrzyńska pokazuje również, że $A\beta$ w zastosowanym modelu prowadzi do redukcji autofagii, a PaPE-1 stymuluje autofagię i normalizuje ekspresję kluczowych białkowych komponentów (takich jak: BECN1, ATG5, ATG7 i

AMBRA). Istotne jest również powiązanie tych efektów z modulacją ekspresji i lokalizacji receptorów estrogenowych: PaPE-1 zwiększa poziomy ESR1/ESR2 w frakcji błonowej, a analizy z antagonistami wskazują na krytyczną rolę ESR1.

Trzecim, bardzo wartościowym aspektem jest włączenie komponentu epigenetycznego. Autorka pokazała, że PaPE-1 moduluje metylację promotorów wybranych genów związanych z apoptozą, autofagią i sygnalizacją estrogenową, oraz zwiększa aktywność acetylaz histonowych (HAT). Zestawienie zmian metylacji z kierunkiem zmian ekspresji (wraz z dyskusją przypadków nie w pełni zgodnych, jak Bcl2) świadczy o dojrzałej interpretacji i unikaniu uproszczonych wniosków.

W części dotyczącej neurozapalenia Doktorantka wykazała, że A β nasila odpowiedź zapalną w neuronach i mikrogleju (m.in. wzrost aktywności kaspazy-1, pozakomórkowego poziomu ATP oraz IL1 β /NLRP3), natomiast PaPE-1 w istotnym stopniu osłabia część tych zmian.

Na podstawie przedstawionych oświadczeń współautorów oraz sposobu prezentacji cyklu badań należy uznać, że Pani mgr Bernadeta Pietrzak-Wawrzyńska wniosła istotny wkład intelektualny i eksperymentalny w powstanie prac stanowiących podstawę rozprawy. W szczególności ważne jest, że pełni rolę pierwszego autora i autora korespondującego w obu publikacjach, a opisany wkład obejmuje planowanie doświadczeń, prowadzenie hodowli komórkowych, wykonanie analiz biochemicznych i molekularnych, opracowanie analiz statystycznych, przygotowanie figur oraz udział w przygotowaniu manuskryptów.

Moje nieliczne uwagi mają charakter dyskusyjny i nie podważają wysokiej wartości merytorycznej pracy, a wynikają z obowiązków recenzenta oraz chęci doprecyzowania interpretacji.

1. Wybór dawki PaPE-1 (10 μ M) jest spójny z literaturą dotyczącą bardzo niskiego powinowactwa liganda do ESR1/ESR2, jednakże w kontekście translacyjnym warto wyraźniej omówić ryzyko efektów ubocznych przy stężeniach z zakresu μ M oraz potencjalną aktywację komponenty jądrowej przy wyższych dawkach. Jak autorka ocenia „okno terapeutyczne” PaPE-1 i jakie dane (własne lub literaturowe) uzasadniają bezpieczeństwo długotrwałej ekspozycji?

2. Ocena autofagii opiera się w dużej mierze na markerach statycznych (liczba pęcherzyków, poziomy wybranych białek). Warto podkreślić, że wzrost liczby autofagosomów może oznaczać zarówno indukcję, jak i zahamowanie przepływu autofagicznego. Które elementy przedstawionych danych najsilniej przemawiają za przywróceniem przepływu autofagicznego, i jakie dodatkowe eksperymenty byłyby najbardziej rozstrzygające?
3. W badaniach wpływu A β i PaPE-1 na mikroglej Pani mgr Bernadeta Pietrzak-Wawrzyńska wykorzystwała linię HMC3, która ma ograniczenia w porównaniu z pierwotnym mikroglejem. Jakie różnice w odpowiedzi na PaPE-1 i A β autorka przewidywałaby w mikrogleju pierwotnym lub w układach ko-kultury neuron-mikroglej, i które obserwacje uznałaby za kluczowe do weryfikacji w modelach in vivo?
4. Wyniki dotyczące neurozapalenia wskazują na częściową normalizację wybranych markerów (np. IL1 β), przy mniej jednoznacznym wpływie na inne komponenty (np. NLRP3 w mikrogleju). Jak autorka interpretuje tę selektywność odpowiedzi: czy sugeruje ona działanie na poziomie dojrzewania/uwalniania cytokin, czy raczej upstream/downstream modulację inflamasomu?

Rozprawa Pani mgr Bernadety Pietrzak-Wawrzyńskiej stanowi dojrzałą, dobrze zaplanowaną i metodologicznie rzetelną pracę badawczą, która wnosi istotny wkład do zrozumienia mechanizmów neuroprotekcji związanych z preferencyjną aktywacją pozajądrowej sygnalizacji receptorów estrogenowych. Szczególnie cenne jest wykazanie skuteczności PaPE-1 w paradygmacie leczenia odroczonego, a także powiązanie efektów ochronnych z hamowaniem apoptozy, przywracaniem autofagii, modulacją statusu epigenetycznego oraz częściowym ograniczaniem neurozapalenia w neuronach i mikrogleju.

Na podstawie powyższej oceny stwierdzam, że rozprawa doktorska spełnia wymagania określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. „Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce” (Dz.U. 2024, poz. 1571 z późn. zm.). W związku z powyższym wnioskuję o dopuszczenie Pani mgr Bernadety Pietrzak-Wawrzyńskiej do dalszych etapów

postępowania w sprawie nadania stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu, dyscyplinie nauki medyczne.

Jednocześnie zwracam się do Rady Naukowej Instytutu z propozycją nagrodzenia rozprawy.

Wrocław, 13.01.2026

Prof. dr hab. Dariusz Rakus