

Warszawa 18.01.2026

prof. dr hab. n. med. Joanna B Strosznajder
ul. Bohomolca 6 m 2,
0-1613 Warszawa.

**Recenzja Rozprawy Doktorskiej
mgr Bernadety Pietrzak Wawrzyńskiej pt:**

Inicjowana pozajądrowo sygnalizacja receptorów estrogenowych jako nowy punkt uchwytu terapii neuroprotekcyjnych: identyfikacja molekularnych mechanizmów działania PaPE-1 w hodowlach pierwotnych neuronów oraz komórkach mikrogleju linii HMC3 narażonych na A β .

Praca wykonana w Instytucie Farmakologii im Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk
Pod kierunkiem prof. dr hab. **Malgorzata Kajta** – promotor
dr hab. **Agnieszka Wnuk** –promotor pomocniczy

Ocena pracy doktorskiej zostaje przeprowadzona na mocy ustawy z dnia 20 lipca 2018 roku Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U.z 2023).

Poprzednie dekady to czas intensywnych badań dotyczących etiologii i patomechanizmu sporadycznej postaci choroby Alzheimera (ChA) - najcięższej formy otępienia. Ostatnie 30 lat to również poszukiwanie nowych związków farmakologicznych które mogłyby zapobiec a w ostatecznym przypadku spowolnić lub złagodzić przebieg tej dewastującej choroby neurodegeneracyjnej, która dotyczy obecnie około 30 milionów ludzi na świecie. Według danych WHO przewiduje się, że osób dotkniętych tą chorobą w niedługim czasie w 2050 r będzie ponad 50 milionów. Neuropatologiczne zmiany w chorobie Alzheimera dotyczą zaburzeń białkowych tzn. zwiększonego uwalniania peptydów amyloidu beta (A β) ich oligomeryzacji i agregacji w postaci fibryli i blaszek starczych oraz nagromadzenia się w okolicy zakończeń synaptycznych. Badania Selkoe 1996, Dicksona 1997 wskazywały już na kluczową rolę A β w patomechanizmie ChA. Kolejne lata badań zwracały uwagę, że oligomery A β doprowadzają do degeneracji połączeń synaptycznych i neuronów, w tym szczególnie w

hipokampie, części kory mózgowej, odpowiedzialnej za procesy/mechanizmy pamięci. Wykazano, że oligomeryzacja i agregacja peptydów A β doprowadza do aktywacji mikrogleju i stanów zapalnych oraz do powstawania blaszek starczych które również w sposób mechaniczny uszkadzają funkcję komórek OUN. Dodatkowo kolejnym zjawiskiem neuropatologicznym jest nadmierna fosforylacja białka Tau i tworzenie się wewnątrz komórkowych splątków neurofibrylarnych, które to zmiany doprowadzają do zaburzeń licznych szlaków i procesów wewnątrz neuronów.

Mgr Pietrzak –Wawrzyńska w rozdziale „Wprowadzenie” omówiła wspomniane powyżej zaburzenia neuropatologiczne, które prowadzą w konsekwencji do najcięższej formy otępienia i niemożności samodzielnego funkcjonowania. Doktorantka używa określenia „demencja” a w języku polskim słowo to oznacza „otępienie” aczkolwiek określenie demencja zostało już zaakceptowane i jest używane w języku polskim.

Niestety mimo intensywnych badań wiodących ośrodków naukowych na świecie patomechanizm postaci sporadycznej choroby Alzheimera jest nieznanym, a prowadzone badania wskazują, że choroba ta wywołana jest wieloma czynnikami. Analizowano i proponowano liczne mechanizmy, które mogłyby być odpowiedzialne za patogenezę ChA. Hipoteza amyloidowa zdominowała pozostałe hipotezy i jest aktualna do dnia dzisiejszego pomimo głosów krytycznych. W oparciu o jej założenia kolejne leki zostały zaaprobowane przez FDA i wprowadzone do terapii również w 2024r aczkolwiek z ograniczonym efektem działania i niestety po krótkim czasie od zatwierdzenia przeciwciało monoklonalne przeciwko A β zostało wycofane przez producenta jak np. acunamubab (przez firmę Biogen). Pomimo tych niepowodzeń prowadzone są dalsze poszukiwania nowych związków przeciwdziałających toksyczności peptydów A β w tym również przeciwciał monoklonalnych. Ponadto proponowane są inne strategie terapeutyczne niestety jak na razie mało skuteczne. Istotną przyczyną niepowodzeń jest wprowadzanie leczenia w zaawansowanym etapie choroby. Obecnie stosowane metody diagnostyczne nie umożliwiają wczesnego rozpoznania choroby a występujące zaburzenia pamięci przypisuje się procesowi starzenia oraz zmianom zachodzącym w naczyniach krwionośnych.

W badaniach patogenezy ChA od około 30 lat dominuje hipoteza amyloidowa omówiona poraz pierwszy jak wspomniano powyżej w ostatnich latach dwudziestego wieku. Hipoteza ta jest trafna jeżeli chodzi o rodzinną genetycznie uwarunkowaną postać ChA natomiast nie tłumaczy w pełni przyczyny sporadycznej postaci o późnym początku, która dotyka ponad 90% wszystkich pacjentów z ChA. Niemniej jednak toksyczność peptydów A β wydaje się być istotnym czynnikiem odpowiedzialnym za obserwowane liczne zaburzenia a przeciwdziałanie

toksyczności A β wydaje się być skuteczne w łagodzeniu, spowalnianiu przebiegu tej choroby. Choroba Alzheimerera o późnym początku (określana w skrócie od nazwy w j.angielskim (Late onset Alzheimers Disease-LOAD) występuje częściej u kobiet prawdopodobnie również dlatego, że kobiety żyją generalnie dłużej aniżeli mężczyźni a niestety ryzyko wystąpienia tego typu otępienia zależy od wieku i zwiększa się znacznie po 85 roku życia. Możliwość zapobiegania i lub spowalniania przebiegu ChA u kobiet w okresie po menopauzie stwarza zastosowanie związków farmakologicznie czynnych o właściwościach selektywnej aktywacji receptorów estrogenowych zlokalizowanych poza jądrem komórkowym. Tego typu strategia terapeutyczna powinna eliminować hormonalne działania niepożądane wywołane aktywacją receptorów estrogenowych.

Zespół kierowany przez Panią Profesor Małgorzatę Kajta od lat zaangażowany jest w badaniach umożliwiających poznanie mechanizmów molekularnych działania syntetycznego agonisty poza-jądrowych receptorów estrogenowych, związku PaPE-1 (angielska nazwa: Pathway Preferential Estrogen-1, związek chemiczny :S-5-(4-hydroxy-3,5-dimethyl-phenyl)-indian-1-ol) który selektywnie aktywuje poza-jądrowe szlaki sygnałowe receptorów ESR1 i ESR2. Pani mgr Pietrzak-Wawrzyńska uczestniczyła aktywnie w kilku badaniach dotyczących działania tego związku i jest współautorką prac opublikowanych w Neurotoxicology Res. 2020 oraz 2021 nie wchodzących do pracy doktorskiej. Należy podkreślić, że Autorka ocenianej rozprawy doktorskiej należy do grona badaczy starających się zrozumieć i wyjaśnić mechanizmy molekularne działania tego frapującego związku PaPE-1 w mózgu w różnych warunkach doświadczalnych.

Praca doktorska mgr Pietrzak-Wawrzyńskiej która została przekazana do recenzji to opracowanie hybrydowe składające się z tradycyjnej części opisowej monograficznej poprzedzonej streszczeniem pracy doktorskiej w języku polskim i angielskim, wykazem najczęściej używanych skrótów następnie części opisowej: wprowadzenia, opisu materiałów i metod oraz wyników badań doświadczalnych. Część opisowa obejmuje Wstęp i Cel badań i kolejno omówienie Publikacji 1 a następnie Publikacji 2 i przedstawienie w formie schematycznej zastosowanych metod, uzasadnienie przeprowadzonych badań oraz krótkie omówienie wyszczególnionych z -publikacji zbiorowych - wyników badań Doktorantki, jak również podsumowanie uzyskanych wyników kolejno z dwóch artykułów naukowych. Opracowanie kończy 11 stronicowy rozdział Dyskusja następnie, Podsumowanie i Wnioski oraz Piśmiennictwo zawierające 281 pozycji. Ponadto do przedstawionej do oceny rozprawy doktorskiej dołączono 5 oświadczeń współautorów dwóch załączonych publikacji w tym Autora rozprawy doktorskiej mgr Bernadety A. Pietrzak- Wawrzyńskiej oraz promotora pracy

Prof. dr Małgorzaty Kajta współautora i autora korespondencyjnego obu publikacji. Z załączonych oświadczeń jasno wynika udział poszczególnych autorów w prowadzonych badaniach i w przygotowaniu ostatecznej wersji publikacji ponadto wszyscy czterej współautorzy publikacji złożyli oświadczenie stwierdzające że wyniki badań przedstawione w rozprawie doktorskiej nie zostaną ponownie wykorzystane w żadnym innym postępowaniu o nadanie stopnia naukowego.

Dzięki wymienionemu podziałowi i załączonym oświadczeniom całość opracowania pracy doktorskiej jest przejrzysta i nie budzi wątpliwości.

Wybór tematu pracy doktorskiej Pani mgr B. Pietrzak-Wawrzyńskiej uważam za bardzo ciekawy i bardzo istotny i jest on kontynuacją wcześniej prowadzonych badań naukowych pod kierunkiem Prof. Małgorzaty Kajta.

Badania mgr B. Pietrzak-Wawrzyńskiej przedstawione w pracy doktorskiej zmierzały do oceny neuroprotekcynnego działania syntetycznego estrogenu PaPE-1 w komórkowych modelach choroby Alzheimera.

Działanie związku PaPE1 który preferencyjnie aktywuje receptory estrogenowe (ESR1 i ESR2) zlokalizowane w błonie komórkowej, poza jądrem komórkowym oceniano w modelach doświadczalnych toksyczności peptydów A β . Autorka jasno sformułowała cele badań które zmierzały do wykazania neuroprotekcynnego działania PaPE-1 podanego po uprzednim wielogodzinnym działaniu peptydów A β . Celem jej badań była identyfikację molekularnych procesów zaangażowanych w regulację apoptozy, autofagii i stanu epigenetycznego oraz weryfikacja udziału receptorów ESR1 i ESR2 w mechanizmie przeciwdziałania neurotoksyczności peptydów A β przez zastosowanie syntetycznego estrogenu PaPE-1. Ważnym celem badawczym była ocena udziału PaPE-1 w zapobieganiu aktywacji zjawisk które mogą w konsekwencji prowadzić do procesu zapalnego.

Mgr B. Pietrzak-Wawrzyńska we wstępie omówiła wybrane ważne zagadnienia dotyczące molekularnych mechanizmów sporadycznej postaci ChA w tym udział A β w zaburzeniu równowagi i w przebiegu szlaków pro i anti-apoptotycznych. Doktoranta omówiła zaburzenia procesu apoptozy, autofagii w ChA oraz udział zmian epigenetycznych w patogenezie ChA. Ponadto zwróciła uwagę na bardzo istotne znaczenie procesów zapalnych i udział inflamosomów w tym procesie tzn. komórek mikrogleju i astrocytów oraz odpowiednich receptorów rozpoznających np. wzorce molekularne związane z uszkodzeniem komórek (DAMPs). Przedstawiła ponadto rolę istotnych czynników transkrypcyjnych jak np NF κ B. W kolejnych podrozdziałach mgr B. Pietrzak-Wawrzyńska omówiła zagadnienia dotyczące prewencji, diagnostyki i leczenia ChA. Podjęła się ważnego zadania dotyczącego oceny

ochronnego potencjału roślinnych i syntetycznych estrogenów i mechanizmu ich działania w zapobieganiu i leczeniu ChA i omówiła działanie syntetycznego estrogenu PaPE-1 używanego przez nią w badaniach związku. Doktorantka zaznaczyła ze z analizy działania tego syntetycznego estrogenu wynika, że w działaniu PaPE1 pośredniczą w głównej mierze szlaki sygnałowe receptora błonowego ESR1. Ponadto dane wskazują, że szlaki przekazywania sygnału w których uczestniczą mTOR i MAPK nie powodują aktywacji odpowiedzi z receptorów estrogenowych jądrowych. W dwóch tabelach zostało przedstawione porównanie działania estradiolu i PaPE-1 w różnych wybranych układach doświadczalnych. Przedstawione dane w jasny sposób mówią o działaniu potencjalnie obiecującego związku, agonisty receptorów estrogenowych pozajądrowych, PaPE-1 i w pełni uzasadniają cel dalszych badań dotyczący jego protekcyjnego wpływu w toksyczności peptydów AB.

Doktorantka zaprezentowała szeroka wiedzę i w sposób ciekawy i umiejętny zaprezentowała ją w omówieniu wielu ważnych zagadnień w tym tych które stały się przedmiotem jej badań.

Doktorantka prowadziła badania w modelu eksperymentalnym-komórkowym, toksyczności peptydów A β (eksperymentalny komórkowy model choroby Alzheimera) wywołanym podaniem tych peptydów do hodowli pierwotnych mysich komórek neuronalnych z kory mózgu oraz do komórek ludzkich, mikrogleju, linii HMC3.

Przed przystąpieniem do badań jasno została sformułowana hipoteza badawcza i określone cele badań. Wszystkie sformułowane cele obejmują zbadanie neuroprotekcyjnego potencjału PaPE1 zastosowanego kilka godzin po uprzednim wielogodzinnym działaniu zagregowanych peptydów A β 1-42 a więc w warunkach zbliżonych do sytuacji klinicznej w przypadku podawania leku.

Mgr B Pietrzak –Wawrzyńska postanowiła zbadać molekularne mechanizmów działania PaPE1 na wybrane procesy odpowiedzialne za zjawiska apoptozy, autofagii oraz zmiany epigenetyczne wywołane toksycznością peptydów AB.

Celem jej badań było również określenie udziału receptorów estrogenowych ESR1 i ESR2 i ich ekspresji w neuroprotekcyjnym działaniu PaPE-1 w warunkach toksyczności peptydów A β 1-42.

Ponadto badania dotyczyły działania PaPE1 na ekspresję wyselekcjonowanych genów, które mogą być zaangażowane w procesy zapalne.

W ostatnim sformułowanym celu badań badania miały oceniać nie proces zapalny a zjawiska które mogą być zaangażowane w proces zapalny.

Przeprowadzenie wymienionych badań wymagało bogatego warsztatu metodycznego. Doktorantka zapoznała się i stosowała imponujący, szeroki wachlarz metod o czym świadczą

dobrze starannie opisane metody i ich zastosowanie w tym hodowli linii komórkowych, metody fluorescencyjne, immunofluorescencyjne, immunochemiczne (Western Blot), oraz zastosowanie metod biologii molekularnej jak izolacja mRNA, odwrotna transkrypcja, analiza ilościowa poziomu mRNA z użyciem łańcuchowej reakcji polimerazy QPCR, analiza metylacji genów i metody biochemiczne. Doktorantka znakomicie stosowała te liczne metody w tym również barwienia różnymi odczynnikami (takimi Kalceina AM, Hoechst33342 lub Fluoro -Jade C do wybarwienia degenerujących neuronów).

Do opracowania uzyskanych wyników stosowała odpowiednie metody statystyczne w tym analizę wariancji ANOVA a następnie post hoc Tukey HSD or post hoc Newman-Keuls.

Uzyskane wyniki zostały opisane w dwóch publikacjach: w *Molecular Neurobiology* w 2024 oraz w *Journal of Molecular Biology* 2025. W obu publikacjach mgr B.Pietrzak-Wawrzyńska jest pierwszym autorem. Ponadto część wyników w tym wyniki badań dotyczące działania syntetycznego estrogenu PaPE-1 na komórki mikrogleju poddane działaniu peptydów A β zostały przedstawione w tzw. opisowej części rozprawy doktorskiej.

Analizując wyniki badań uwagę moją zwrócił wykres 2 w części opisowej rozprawy doktorskiej i zaprezentowany znaczny wielokrotny wzrost ekspresji genów prozapalnych w hodowli komórek neuronalnych poddanych działaniu peptydów A β 1-42. Zaprezentowane zmiany dotyczą szczególnie genu *IL1b* oraz *Nlrp3* i to przede wszystkim na poziomie mRNA. Stwierdzono również znaczący wzrost poziomu białka, który ulega znamiennej obniżeniu w wyniku działania PaPE-1. W tekście nie znalazłam ustosunkowania się do tych istotnych zmian w komórkach neuronalnych, w hodowli pierwotnej tych komórek. Powstaje pytanie jak w hodowlach pierwotnych komórek neuronalnych przebiegają reakcje i szlaki przekazywania sygnału na czynniki patogenne w tym związane z odpowiedzią immunologiczną/zapalną w porównaniu do komórek neuronalnych w mózgu dojrzałym i starczym. Czy np. w uszkodzeniach traumatycznych, hipoksyjnych płodów może dochodzić do zwiększonego uwalniania AB i jego toksycznego działania i obserwowanych takich potężnych zmian w ekspresji genów prozapalnych w komórkach neuronalnych. Jeżeli chodzi o wyniki to mam pytanie- użycie jakiej metody pozwoliło na ocenę ilościową ESR1 i ESR2 oraz GPER1 i CYP19A1 na poziomie białka w podanych wartościach-wyniki zaprezentowano na Fig 6 str 12 w publikacji JMB437(2025). Ponadto mam jeszcze jedno pytanie odnośnie stosowanego stężenia peptydu A β na jakiej podstawie używano AB w takim stężeniu i czy po 24h inkubacji analizowano obecność oligomerów i jakich ?.

Podsumowując moją opinie dotyczącą wyników chciałabym zaznaczyć, że bardzo wysoko oceniam starannie zaplanowane i realizowane doświadczenia i przedstawione wyniki.

Uzyskane wyniki badań pozwoliły na sformułowanie bardzo istotnych wniosków, które są adekwatne do założonych celów.

Zastosowane modele umożliwiły analizę licznych procesów zachodzących w chorobie Alzheimera takich jak: zaburzenia apoptozy, autofagii, ekspresji genów i zmiany epigenetyczne zaangażowane w proces zapalny, odgrywający istotne znaczenie w przebiegu tej choroby.

Stwierdzono że podanie syntetycznego estrogenu PaPE-1, który aktywuje receptory estrogenowe zlokalizowane poza jądrem komórkowym przeciwdziała toksyczności zagregowanych peptydów A β 1-42 i wywiera korzystne protekcyjne działanie na komórki neuronalne i komórki mikrogleju. Cytoprotekcyjne działanie PaPE-1 zależne jest od aktywacji receptorów estrogenowych zlokalizowanych w błonach (plazmatycznych) komórek, przede wszystkim receptora ESR1.

Uzyskane wyniki wskazują, że leki aktywujące receptory estrogenowe zlokalizowane poza jądrem komórkowym mogą korzystnie wpływać na przebieg licznych procesów w chorobie Alzheimera.

Opracowanie i przedstawienie warsztatu metodycznego oraz opracowanie badań doświadczalnych oraz sposób przedstawienia wyników świadczy o dużej umiejętności samodzielnego prowadzenia badań naukowych przez mg B.Pietrzak-Wawrzyńską.

Rozdział „Dyskusja” został opracowany wyczerpująco a omówienie stosowanego modelu i przedyskutowanie uzyskanych wyników zostało stosownie przeprowadzone w oparciu o wcześniejsze własne wyniki i dane dostępne w literaturze światowej. Na podkreślenie zasługuje fakt o którym mówi Doktoranta w Dyskusji, że mimo licznych danych o neuroprotekcyjnym działaniu estrogenów znaczenie aktywacji receptorów estrogenowych zlokalizowanych w błonach komórki poza jej jądrem komórkowym na przebieg choroby Alzheimera jest do chwili obecnej słabo poznanym i przeanalizowanym zagadnieniem. Obecnie dostępne dane i wyniki ostatnich badań Doktorantki wskazują na prawdopodobnie duże potencjalne terapeutyczne znaczenie syntetycznych estrogenów o działaniu wykluczającym udział jądrowych receptorów estrogenowych w zapobieganiu zaburzeń otępiennych i w leczeniu lub spowalnianiu Chorobie Alzheimera u kobiet.

Praca doktorska została opracowana ciekawie z użyciem poprawnego języka naukowego aczkolwiek występują niezbyt ściśle sformułowania a niekiedy również określenia w tym zapożyczone z języka angielskiego.

W pierwszym zdaniu wprowadzenia oczekiwałabym przypomnienia, że od momentu opisanego schorzenia w 1907 roku przez Alzheimer, badania nad patogenenezą tej najcięższej formy otępienia nabrały dynamiki dopiero w ostatnich dekadach XX wieku a liczne ośrodki naukowe zwróciły uwagę na rolę białek o zmienionej konformacji w tym peptydów A β i białka Tau. Koniecznym należałoby wspomnieć że nie stężenie poziomu peptydów AB i białka Tau ale zmiana ich konformacji i nadmierne ufosforylowanie w przypadku białka Tau świadczy o ich toksyczności. Uważam, że należałoby przytoczyć przynajmniej poza Knopman i wsp. 2021 niektórych ważnych badaczy jak Terry i wsp 1964, Wiśniewski i Terry 1973, Selkoe 1996, Dickson 1997. Uważam ponadto, że należałoby się zdystansować co do określenia liczby chorych na ChA dane dostępne są bardzo różne i w zależności od źródeł informacji określa się obecnie chorych na ChA na około 30 milionów osób a w 2050 przewiduje się 50 milionów. Niektóre inne opracowania podają, że już obecnie chorych jest 50 milionów i w 2050 będzie ta liczba podwojona. Niezależnie od tych rozbieżnych danych ChA dotyka znaczącej grupy ludzi na całym świecie i co istotne w obliczu starzejących się społeczeństw stanowi bardzo ważny problem społeczny i ekonomiczny. Choroba ta występuje częściej u kobiet, ale należałoby również zaznaczyć, że kobiety żyją dłużej a znaczący wzrost zachorowań na sporadyczną późną postać choroby obserwuje się po 85 roku życia. Pomimo przedstawionych uwag i pewnej liczby niezbyt precyzyjnych i poprawnych sformułowań oraz nie zawsze najbardziej trafnych cytacji z pośród bardzo bogatego piśmiennictwa moja całościowa ocena pracy doktorskiej jest bardzo dobra. Na podkreślenie zasługuje bardzo bogaty wachlarz stosowanych metod i bardzo ciekawy wartościowy z poznawczego i aplikacyjnego punktu widzenia temat badawczy. Bardzo wartościowe są przede wszystkim uzyskane wyniki badań i płynące z nich wnioski.

Pani mgr Bernadeta Pietrzak –Wawrzyńska wykazała się umiejętnością przekazania informacji i przedstawienia poglądów i danych z literatury oraz formułowania celów badawczych, ich realizowania i kolejno przedstawienia odpowiednich i ważnych wniosków.

Podsumowując stwierdzam, że praca doktorska mgr Bernadety Pietrzak –Wawrzyńskiej stanowi bardzo ciekawe opracowanie nowatorskiego zagadnienia naukowego o dużym potencjale aplikacyjnym. Przedstawione wyniki badań wskazują na mechanizmy działania neuroprotekcyjnego syntetycznego estrogenu który aktywuje receptory zlokalizowane poza jądrem komórki i tym samym może zapobiegać przed niekorzystnymi dla organizmu efektami ubocznymi estrogenów.

Rozprawa doktorska wskazuje na umiejętność prawidłowego prowadzenia pracy badawczej przez Doktorantkę. Oceniana przeze mnie praca spełnia ustawowe wymogi stawiane rozprawie

na stopień doktora określone w art.187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018r. Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce.

Z pełnym przekonaniem stawiam wniosek do Rady Naukowej Instytutu Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk o dopuszczenie mgr Bernadety Pietrzak-Wawrzyńskiej do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu, dyscyplinie nauki medyczne.

Podpisano,



Prof. dr hab. n. med. Joanna Benigna Strosznajder

Warszawa, 18 stycznia 2026

