



Dr hab. Anna Błasiak, prof. UJ
Zakład Neurofizjologii i Chronobiologii
Wydział Biologii
Uniwersytet Jagielloński

Kraków, 06.02.2026

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Bernadety Pietrzak-Wawrzyńskiej

„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
pod kierunkiem prof. dr hab. Małgorzaty Kajty - promotor
i dr hab. Agnieszki Wnuk - promotor pomocniczy**

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska mgr Bernadety Pietrzak-Wawrzyńskiej dotyczy wpływu aktywacji pozajądrowych receptorów estrogenowych za pomocą PaPE-1 (Pathway Preferential Estrogen), na pierwotne hodowle mysich komórek neuronalnych oraz linię komórkową ludzkiego mikrogleju HMC3 eksponowanych na amyloid- β (A β).

Tematyka badawcza podjęta przez Autorkę to niezwykle istotne zagadnienie, dotyczy bowiem poszukiwania bezpiecznych i skutecznych strategii neuroprotektoryjnych w kontekście chorób neurodegeneracyjnych, w szczególności choroby Alzheimera (Alzheimer disease, AD), która stanowi jedno z kluczowych wyzwań współczesnej medycyny i zdrowia publicznego. Mimo intensywnych badań nad rolą sygnalizacji estrogenowej w ochronie układu nerwowego, wiedza dotycząca tego, w jakim stopniu selektywna aktywacja pozajądrowych szlaków receptorów estrogenowych może zapewniać efekt ochronny, jednocześnie ograniczając ryzyko działań niepożądanych typowych dla klasycznej terapii hormonalnej, wciąż pozostaje niepełna. Z tego względu podjęcie badań nad związkami preferencyjnie uruchamiającymi pozajądrowe ścieżki sygnalizacji poprzez receptory estrogenowe, stanowi kierunek uzasadniony i aktualny, mogący wnieść ważny wkład w zrozumienie komórkowych podstaw neuroprotekcji w warunkach ekspozycji na A β .

Badania opisane w dysertacji powstały w wyniku realizacji projektu badawczego Narodowego Centrum Nauki OPUS 20 „Selektywna aktywacja szlaków sygnałowych niejądrowych receptorów estrogenowych przez PaPE-1 jako nowe podejście terapeutyczne wobec sporadycznej postaci choroby Alzheimera”, kierowanego przez prof. dr hab. Małgorzatę Kajtę, będącą promotorką pracy doktorskiej Autorki. Sama rozprawa to praca hybrydowa, na którą składają się wyniki opublikowane w dwóch oryginalnych artykułach naukowych oraz przedstawione w niezależnej części opisowej.



We Wprowadzeniu Autorka w syntetyczny sposób przedstawiła najważniejsze zagadnienia związane z etiologią choroby Alzheimera, wybranymi mechanizmami molekularnymi towarzyszącymi jej patogenezie, a także czynnikami ryzyka, diagnostyką oraz stosowanymi terapiami. Ważnym elementem tej części dysertacji jest wprowadzenie do zagadnień związanych z ochronnym potencjałem estrogenów w choroby Alzheimera oraz sygnalizacji aktywowanej przez pozajądrowe receptory estrogenowe. W tym kontekście warto byłoby również wspomnieć, że błonowe receptory estrogenowe mogą modulować pobudliwość neuronów i transmisję synaptyczną poprzez wpływ na aktywność kanałów jonowych, z pominięciem mechanizmów transkrypcyjnych. Autorka wskazuje na istotnie częstsze występowanie choroby Alzheimera u kobiet oraz na wzrost zachorowalności po menopauzie, co silnie sugeruje związek zmian poziomu hormonów płciowych, w szczególności estrogenów, z rozwojem choroby. Przedstawione w tej części rozprawy dane, wraz z właściwymi odnośnikami do literatury tematu, świadczą o właściwym przygotowaniu teoretycznym Autorki, spełniającym wymagania stawiane osobom ubiegającym się o nadanie stopnia doktora w dyscyplinie nauki medyczne.

Hipotezy badawcze, przedstawione w czterech odrębnych punktach, jasno precyzują założenia pracy, a sformułowane cele badań logicznie je uzupełniają i umożliwiają ich weryfikację. Przedstawione hipotezy zakładają, że PaPE-1, poprzez selektywną aktywację niejądrowych szlaków sygnałowych receptorów estrogenowych ESR1/ESR2, wywiera efekt neuroprotektyny wobec toksyczności A β . Ochrona ta ma obejmować hamowanie apoptozy, nasilenie autofagii powiązane ze zmianami epigenetycznymi, zależec od udziału ESR1 i/lub ESR2 oraz obejmować modyfikację odpowiedzi zapalnej w neuronach i/lub w ludzkich komórkach mikrogleju HMC3.

W kolejnej części Autorka w precyzyjny i zwięzły sposób podsumowuje zastosowane metody i kluczowe wyniki opisane w pierwszej oryginalnej publikacji wchodzącej w skład dysertacji **Posttreatment with PaPE-1 Protects from A β -Induced Neurodegeneration Through Inhibiting the Expression of Alzheimer's Disease-Related Genes and Apoptosis Process That Involves Enhanced DNA Methylation of Specific Genes**, opublikowanej w czasopiśmie *Molecular neurobiology* (2024), której jest pierwszą autorką. Załączone tabele oraz schematy eksperymentów stanowią cenne, uporządkowane opracowanie oryginalnego doniesienia i istotnie ułatwiają czytelnikowi śledzenie logiki badań, interpretację uzyskanych rezultatów oraz powiązanie ich z celami dysertacji. Autorzy publikacji dowiedli, że odroczone w stosunku do czasu ekspozycji na A β , podanie PaPE-1 istotnie ogranicza neurodegenerację indukowaną A β w modelu hodowli pierwotnych mysich neuronów korowych. Wykazano, że PaPE-1 przywraca wzrost neurytów, hamuje ekspresję wybranych genów związanych z chorobą Alzheimera (m.in. Rbfox, Apoe, Bace2, App, Ngrn; przy jednoczesnej stymulacji Chat) oraz wywołuje efekt antyapoptotyczny. Jednocześnie potwierdzono, że działanie to obejmuje obniżenie ekspresji kluczowych mediatorów apoptozy oraz zmianę statusu metylacji DNA, co wskazuje na udział mechanizmów epigenetycznych w hamowaniu apoptozy wywołanej przez A β .



W podobny, klarowny i logiczny sposób przedstawiona została druga oryginalna publikacja **Non-nuclear Estrogen Receptor Signaling as a Promising Therapeutic Target to Reverse Alzheimer's Disease-related Autophagy Deficits and Upregulate the Membrane ESR1 and ESR2 Which Involves DNA Methylation-dependent Mechanisms**, w której Autorka dysertacji także jest pierwszą autorką, a która opublikowana została w czasopiśmie *Journal of Molecular Biology* (2025). W pracy tej Autorzy wykazali między innymi, że odroczone podanie PaPE-1 wywiera istotny efekt neuroprotekcyny w komórkowym modelu choroby Alzheimera, odwraca indukowane przez A β upośledzenie autofagii oraz zwiększa poziom błonowych frakcji receptorów ESR1 i ESR2. Wykazano także, że PaPE-1 nie modyfikuje globalnego poziomu metylacji DNA, natomiast zmniejsza kondensację chromatyny.

Opisowa część dysertacji to logiczna kontynuacja przedstawionych wcześniej prac oryginalnych, rozszerzona o zbadanie wpływu A β na komórki mikrogleju (komórkową linię ludzkiego mikrogleju HMC3). Autorka wykazała, że ekspozycja na A β w badanych modelach komórkowych wywołuje cechy nasilonej odpowiedzi prozapalnej, natomiast PaPE-1 w istotnym stopniu łagodzi część tych zmian. W pierwotnych hodowlach neuronalnych, ekspozycja na A β zwiększała aktywność kaspazy-1 i poziom pozakomórkowego ATP, a także podnosiła ekspresję wybranych markerów zapalnych. Podanie PaPE-1 po ekspozycji na A β ograniczało wzrost aktywności kaspazy-1 i poziomu ATP oraz częściowo normalizowało nasiloną ekspresję markerów odpowiedzi zapalnej. W badaniach przeprowadzonych na komórkach mikrogleju Autorka wykazała, że wpływ A β na badane komórki zależy od stopnia jego agregacji: mniej zagregowane formy wiązały się z obniżeniem aktywności metabolicznej, natomiast bardziej zagregowane, ze wzrostem tego parametru. W warunkach przedłużonego działania A β , PaPE-1 obniżał podwyższoną aktywność metaboliczną mikrogleju oraz odwracał zmiany morfologiczne charakterystyczne dla aktywacji. Jednocześnie PaPE-1 redukował indukowany przez A β wzrost poziomu IL1 β , natomiast jego wpływ na NLRP3 był ograniczony i zależny od warunków eksperymentalnych. Podsumowując uzyskane wyniki Autorka wskazuje, że PaPE-1 działa ochronnie głównie poprzez modulację wybranych elementów odpowiedzi zapalnej indukowanej przez A β w neuronach i mikrogleju, przy czym efekt ten ma charakter częściowy i jest zależny od analizowanego wskaźnika oraz typu komórek, co jest bardzo istotne z punktu widzenia poszukiwania nowych strategii terapeutycznych choroby Alzheimera.

Rozprawę zamyka napisana dojrzałe i konsekwentnie prowadzona Dyskusja, w której Autorka sprawnie integruje własne wyniki z bardzo bogatą literaturą przedmiotu, trafnie osadzając je w kontekście różnic płciowych w ryzyku choroby Alzheimera, ograniczeń klasycznej terapii estrogenowej oraz potrzeby rozwoju ligandów ukierunkowanych na pozajądrową sygnalizację ESR1/ESR2. Na podkreślenie zasługuje krytyczne podejście do wybranych cytowanych doniesień i unikanie ich nadinterpretacji. Równocześnie Autorka akcentuje aspekt translacyjny własnych badań poprzez zastosowanie paradygmatu odroczonego podania PaPE-1 względem



A β oraz rozszerzenie analiz o wpływ ekspozycji na A β na komórki mikrogleju linii HMC3, co wzmacnia wagę wniosków dotyczących wpływu A β na procesy związane z neurozapaleniem. Dla pełniejszego domknięcia interpretacji warto byłoby zaznaczyć ograniczenia wynikające z zastosowanego modelu badawczego opartego na hodowlach pierwotnych i liniach komórkowych. Całość prowadzi do trafnych, dobrze uzasadnionych Wniosków, a syntetyczne podsumowanie wszystkich wyników wraz z ich graficzną reprezentacją stanowić może materiał wyjściowy zarówno do dalszych, ukierunkowanych eksperymentów, jak i do przygotowania artykułu przeglądowego.

Przedstawione w rozprawie doktorskiej wyniki stanowią oryginalne rozwiązanie konkretnego problemu naukowego i dostarczają nowych, istotnych informacji o wpływie zagregowanego A β na mysie pierwotne neurony oraz ludzkie komórki mikrogleju HMC3, w szczególności w odniesieniu do procesów charakterystycznych dla choroby Alzheimera, takich jak apoptoza, dysfunkcja autofagii, odpowiedź zapalna oraz swoiste zmiany epigenetyczne. Co ważne wykazano, że odroczone podanie PaPE-1 częściowo odwraca te zaburzenia, a opisane efekty ochronne PaPE-1 są zależne od ESR1, co wspiera koncepcję terapii choroby Alzheimera opartej na selektywnej aktywacji pozajądrowej sygnalizacji estrogenowej.

Poniżej przedstawiam pytania/komentarze związane z lekturą dysertacji;

- Jaki był przybliżony stosunek komórek glejowych do neuronów w badanych hodowlach pierwotnych i czy proporcje te były podobne pomiędzy badanymi warunkami eksperymentalnymi? Ponieważ obecność komórek glejowych, a w szczególności astrocytów, znacząco pływa na dojrzewanie neuronów i sieci neuronalnej w hodowlach pierwotnych, a tym samym na poziom aktywności neuronalnej, czynnik ten może mieć istotne znaczenie dla interpretacji wyników.
- Czy PaPE-1 może wpływać na aktywność neuronalną? Wydaje się to być istotne, ponieważ aktywność neuronalna może zmieniać lokalną agregację A β ; w związku z tym warto rozważyć, czy efekty neuroprotektcyjne PaPE-1 nie wynikają, przynajmniej częściowo, właśnie z modulacji aktywności neuronalnej.
- Jak definiowano/wyznaczano obrazowane, a następnie porównywane obszary (regions of interest, ROI) w badanych grupach? Czy w eksperymentach, w których porównywano intensywność fluorescencji pomiędzy badanymi warunkami, występowały również różnice w obszarze zajmowanym przez analizowany sygnał (area fraction)?
- Jakie były kryteria wyboru komórek mikrogleju z zaznaczonych na Rycinie 5 ROI, które poddawane były następnie analizie kształtu (z zaznaczonych ROI wybrano i przedstawiono obrysy tylko paru komórek)? Jak Autorka interpretuje przedstawioną zmianę minimalnej średnicy Ferreta i czy zmianie uległ stosunek osi (aspect ratio)?
- Autorka wskazuje, że „Selektywna aktywacja inicjowanej pozajądrowo sygnalizacji receptorów estrogenowych ESR1 i ESR2 umożliwia neuroprotekcję, a równocześnie



pozwala uniknąć niebezpiecznych skutków ubocznych, które związane są głównie z klasyczną (jądrową, transkrypcyjną) ścieżką działania estrogenów.” Wobec małej liczby prac na zwierzętach przeprowadzonych z użyciem PaPe-1, co wynika po części z faktu niedawnego odkrycia badanej cząsteczki, stwierdzenie takie wydaje się być przedwczesne, pozostawiając jednocześnie szerokie pole do planowania przyszłych eksperymentów.

Podsumowując, wysoko oceniam rozprawę doktorską mgr Bernadety Pietrzak-Wawrzyńskiej, która stanowi oryginalne i merytorycznie wartościowe rozwiązanie istotnego problemu naukowego. Praca ma charakter nowatorski; zgromadzone w niej wyniki w sposób istotny pogłębiają zrozumienie mechanizmów neuroprotekcynowego działania pozajądrowej sygnalizacji estrogenowej w patologii choroby Alzheimera, a jednocześnie tworzą solidne podstawy do projektowania kolejnych eksperymentów, w tym dążących do opracowania nowych strategii terapeutycznych wobec sporadycznej postaci choroby Alzheimera.

Stwierdzam, że rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (t.j. Dz. U. 2024, poz.1571 z późn. zm.) i wnioskuję 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.