



WARSZAWSKI
UNIwersytet
MEDYCZNY

RPN / 14838 / 2023
Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu
BIURO
RADY DISCYPLINY NAUKI FARMACEUTYCZNE
Podpis 7.08.2023 [Signature]

KATEDRA I ZAKŁAD BIOCHEMII I FARMAKOGENOMIKI

dr hab. n. farm. Monika Ewa Czerwińska
Katedra i Zakład Biochemii i Farmakogenomiki
Warszawski Uniwersytet Medyczny
Wydział Farmaceutyczny
Adres e-mail: monika.czerwinska@wum.edu.pl

Warszawa, 2.08.2023

Recenzja dorobku naukowego, dydaktycznego i organizacyjnego

dr n. med. i n. o z. Benity Wiatrak

oraz cyklu publikacji składających się na osiągnięcie naukowe pt.

„Neurozapalenie w chorobie Alzheimerera – badanie roli amyloidu- β i aktywności przeciwzapalnej nowych pochodnych 1,2-tiazyny w hodowlach komórek neuronopodobnych”

1. Przebieg kształcenia oraz pracy zawodowej

Pani dr Benita Wiatrak w 2011 r. ukończyła studia I stopnia na kierunku Inżynieria Biomedyczna, na Wydziale Podstawowych Problemów Techniki Politechniki Wrocławskiej. Obroniła pracę inżynierską pt. *Analiza EEG u pacjentów z depresją*, wykonaną pod opieką dr. inż. Mirosława Łąki. Z kolei w 2012 r. na podstawie obrony pracy magisterskiej pt. *Analiza i wykrywanie zmian chorobowych na zobrazeniach gałki ocznej*, wykonanej pod kierunkiem prof. dr. hab. inż. Marka Ogieli, uzyskała dyplom ukończenia studiów II stopnia w Międzywydziałowej Szkole Inżynierii Biomedycznej Akademii Górniczo-Hutniczej im. Stanisława Staszica w Krakowie. Dodatkowo w 2013 r. ukończyła studia podyplomowe „Biomateriały – materiały dla medycyny” na Wydziale Inżynierii Materiałowej i Ceramiki Akademii Górniczo-Hutniczej w Krakowie.

W latach 2014-2018 Habilitantka była doktorantką w Katedrze i Zakładzie Podstaw Nauk Medycznych Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu, gdzie uchwałą Rady Dyscypliny Nauki Farmaceutyczne, 7 listopada 2019 r., na podstawie obrony rozprawy doktorskiej pt. *Neuroprotektoryjne i neuroregeneracyjne działanie wybranych polifenoli w hodowlach komórkowych w modelu neurodegeneracji typu Alzheimerera* uzyskała stopień doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki farmaceutyczne. Pracę tę przygotowała pod kierunkiem promotora prof. dr. hab. Kazimierza Gąsiorowskiego.

Początkowo kontynuowała pracę na stanowisku asystenta w Katedrze i Zakładzie Podstaw Nauk Medycznych Wydziału Farmaceutycznego, a od 2020 r. do chwili obecnej pracuje w Katedrze i Zakładzie Farmakologii Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu, gdzie początkowo zajmowała stanowisko asystenta, a obecnie – adiunkta.

2. Ocena aktywności naukowo-badawczej

Na podstawie danych bibliometrycznych przygotowanych przez Filię nr 1 Biblioteki Głównej Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu można stwierdzić, że dorobek dr Benity Wiatrak przed uzyskaniem stopnia doktora obejmuje 5 publikacji o sumarycznym współczynniku oddziaływania IF 6,276 oraz łącznej liczbie punktów Ministerstwa Edukacji i Nauki (MEiN) 208. Na szczególną uwagę zasługuje z kolei jej działalność po uzyskaniu stopnia doktora, której wynikiem jest 57 publikacji (52 z wyłączeniem cyklu) z listy Journal Citation Reports (JCR). Według wykazu osiągnięć wskazanego przez Habilitantkę w załączonej dokumentacji jej dotychczasowy dorobek obejmuje łącznie 13 publikacji (5 z listy JCR) przed uzyskaniem stopnia doktora oraz 58 publikacji po uzyskaniu stopnia doktora, co należy uznać za znaczący dorobek publikacyjny na tym etapie rozwoju naukowego. W 15 publikacjach dr Wiatrak jest pierwszym autorem (włączając publikacje pod nazwiskiem Kostrzewa), spośród których 9 znajduje się na liście JCR, a w 6 – ostatnim autorem. W 17 publikacjach pełniła funkcję autora korespondującego. Sumaryczny IF prac, w których Pani doktor jest autorem/współautorem, wynosi 312,027 (286,053 z wyłączeniem cyklu), a suma punktów MEiN – 7120 (6610 z wyłączeniem cyklu). Do grudnia 2022 r. prace te zostały zacytowane 313 (234 bez autocytowań) razy, a według Web of Science Cor Collection indeks Hirscha wynosi 9.

Pani dr Benita Wiatrak już w czasie studiów wykazywała znaczną aktywność naukową. Jako wolontariuszka współpracowała z Pracownią Sztucznego Serca Fundacji Rozwoju Kardiologii im. Zbigniewa Religii w Zabrze, biorąc udział w projekcie nad biogodnością biomateriałów i protez serca oraz w tworzeniu bazy danych o mechanicznym wspomaganie serca. Przed uzyskaniem stopnia doktora Habilitantka była wykonawcą w projekcie współfinansowanym przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju (PBS1/A9/17/2012) pod kierunkiem prof. dr. hab. Andrzeja Koteckiego, realizowanego w ramach konsorcjum Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu, Uniwersytetu Wrocławskiego i Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu. Pani dr była także wykonawcą w projekcie promotorskim (STM.D130.16.036) realizowanym pod opieką prof. dr. hab. Kazimierza Gąsiorowskiego. Brała również czynny udział w pracach zespołowych, których wynikiem są cztery rozdziały w monografiach naukowych opublikowanych przez polskie wydawnictwa takie jak TYGIEL, Epigraf czy Polskie Towarzystwo Towaroznawcze. W trzech z nich Habilitantka jest pierwszym autorem.

Po uzyskaniu stopnia doktora Habilitantka jako wykonawca uczestniczyła w realizacji trzech projektów wspieranych finansowo przez Europejski Fundusz Rozwoju Regionalnego (w ramach Poddziałania 4.1.1 Programu Operacyjnego Inteligentny Rozwój 2014-2020; POIR.04.01.01-00-0006/19), Narodowe Centrum Nauki (2012/06/M/NZ4/00138) oraz Ministerstwo Edukacji i Nauki (w ramach programu „Regionalna Inicjatywa Doskonałości”; 016/RID/2018/19). W czterech projektach finansowanych z subwencji przyznanej Uniwersytetowi Medycznemu we Wrocławiu (SUBK.D040.22.030; SUBK.D030.22.052; SUBK.D080.22.062; SUBK.D150.22.027) brała również udział jako wykonawca.

Ponadto na uwagę zasługuje fakt, że Pani dr jest współautorką jednego wynalazku, jakim jest „Urządzenie mikrofluidalne do prowadzenia hodowli komórek w gradiencie substancji bioaktywnej”. Ponadto znalazła się w zespole autorów czterech zgłoszeń patentowych w Polsce oraz dwóch zgłoszeń międzynarodowych, stanowiących rozszerzenie zgłoszeń do Urzędu Patentowego RP. Osiągnięcia te są wynikiem wieloletniej współpracy z dr. inż. Romanem Szafranem z Zakładu Inżynierii Chemicznej na Wydziale Chemicznym Politechniki Wrocławskiej.

W czasie studiów doktoranckich Habilitantka odbyła ponad 3-miesięczny staż naukowy w Pracowni Biologii Molekularnej Kliniki Transplantacji Szpiku, Onkologii i Hematologii Dziecięcej Uczelni macierzystej – Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu. Zdobyła wówczas doświadczenie w przygotowaniu materiału genetycznego do oceny ekspresji genów, tj. z zakresu izolacji DNA/RNA, przeprowadzania i analizy wyników elektroforezy oraz PCR. W ramach szkolenia *post-doc* odbyła 3-tygodniowy staż naukowy w Department of Animal Anatomy, National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine w Kijowie, gdzie nauczyła się postępowania z materiałem histopatologicznym i cytologicznym. Ponadto dr Wiatrak uczestniczyła w licznych szkoleniach z zakresu zastosowania technik hodowli komórek zwierzęcych *in vitro* w badaniach biomedycznych, statystyki w medycynie, cytometrii przepływowej czy PCR. Umiejętności zdobyte w czasie tych kursów zostały z powodzeniem wykorzystane w badaniach prowadzonych przez Habilitantkę. Z pewnością stały się one podstawą jej wyróżniającego się dorobku naukowego i zostały docenione przez współpracowników. Na szczególną uwagę zasługuje bowiem działalność Habilitantki w ramach współpracy – poza Uczelnią macierzystą – z zespołami:

▪ międzynarodowymi:

- ze Spinal Repair Unit, Department of Brain Repair and Rehabilitation, University College London (UCL) Institute of Neurology w zakresie zastosowania komórek izolowanych z opuszki węchowej do regeneracji uszkodzenia rdzenia kręgowego oraz możliwości wykorzystania macierzy międzykomórkowej CorMatrix w neurobiologii (z dr. Wojciechem Fortuna);

- z Department of Psychology, College of Arts & Sciences, American University of Iraq w Bagdadzie w zakresie przygotowania technik biologicznych i testów psychologicznych wspomagających wczesne wykrywanie objawów demencji;

▪ krajowymi:

- z Zakładem Inżynierii Chemicznej na Wydziale Chemicznym Politechniki Wrocławskiej w zakresie opracowania systemu *lab-on-a-chip* do prowadzenia badań cytotoksyczności substancji chemicznych w gradiencie stężeń i umożliwiającego prowadzenie badań w mikrośrodkowisku komórek neuronalnych i mikrogleju;

- z Oddziałem Fizykochemii Biomedycznej Instytutu Niskich Temperatur i Badań Strukturalnych Polskiej Akademii Nauk w zakresie oceny biogodności i aktywności biologicznej materiałów opartych na hydroksyapatycie;

- z Zakładem Biogeochemii i Mikrobiologii Środowiskowej Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu w zakresie oceny aktywności przeciwnowotworowej *Solanum nigrum* L.;

- z Katedrą Biostruktury i Fizjologii Zwierząt Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu w zakresie badania włókien lnianych modyfikowanych genetycznie oraz aktywności ekstraktów z różnych rodzajów grzybów na modelach komórkowych w warunkach *in vitro*;

- z Ośrodkiem Badawczo-Naukowo-Dydaktycznym Chorób Otepiennych w Ścinawie w ramach wielośrodkowej współpracy w zakresie przygotowania technik biologicznych i testów psychologicznych wspomagających wczesne wykrywanie objawów demencji.

Jednocześnie dr Benita Wiatrak współpracuje z wieloma jednostkami w obrębie Uczelni macierzystej, takimi jak Katedra Morfologii i Embriologii Człowieka, Katedra i Zakład Chemii Leków, Katedra i Zakład Chemii Nieorganicznej (obecnie Katedra i Zakład Podstawowych Nauk Chemicznych), Katedra i Zakład Chemii Organicznej i Technologii Leków, Katedra i Zakład Bromatologii i Dietetyki (obecnie Katedra i Zakład Dietetyki i Bromatologii), Katedra Biologii i

Biotechnologii Farmaceutycznej, Katedra i Zakład Toksykologii oraz Klinika i Katedra Gastroenterologii i Hepatologii.

Dr Benita Wiatrak jest współautorką łącznie 68 doniesień konferencyjnych o zasięgu krajowym (50), jak i międzynarodowym (18). Po uzyskaniu stopnia doktora wyniki prac były prezentowane w postaci 10 doniesień, wśród nich – 7 – na konferencjach międzynarodowych, podczas których Habilitantka lub inni współautorzy przedstawiali rezultaty badań w postaci wystąpień ustnych lub plakatów.

W ramach prowadzonej działalności naukowej dr Wiatrak zajmuje się głównie zagadnieniami z zakresu neurobiologii. Celem prowadzonych przez Habilitantkę badań jest między innymi ocena aktywności związków syntetycznych czy produktów pochodzenia naturalnego w modelach komórkowych w warunkach *in vitro*. W dotychczasowych pracach skupiała się przede wszystkim na określeniu ich znaczenia neuroprotektynowego lub neuroregeneracyjnego (polifenole), przeciwnowotworowego (pochodne oksazolo[5,4-d]pirymidyny oraz pirydokarbazoli, psianka czarna *Solanum nigrum* L., żagwiowiec *Polyporus* P., pniarek brzozy *Fomitopsis betulina*), antyoksydacyjnego, przeciwzapalnego (oleje tłoczone na zimno, betalainy z grupy gomfrenin pozyskane z miłowoju białego *Basella alba* f. *rubra*) czy potencjalnego wykorzystania w procesie gojenia ran (np. włókna lniane). Obecnie działania Habilitantki wiążą się z badaniem mikrośrodowiska neuronalnego oraz procesu neurozapalenia. Jednym z kierunków jest temat procesów neurozapalenia i demielinizacji w modelach *in vitro* i *in vivo* w kontekście związku między cukrzycą typu II a rozwojem choroby Alzheimera. Projekt ten prowadzony we współpracy z Katedrą i Zakładem Toksykologii Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu wydaje się być szczególnie ciekawy i jednocześnie wpisujący się w tematykę zainteresowań Habilitantki.

W związku z powyższym można jednoznacznie stwierdzić, że dr Benita Wiatrak jest naukowcem o znacznej aktywności badawczej popartej licznymi publikacjami o zasięgu międzynarodowym. W dotychczasowej pracy do stworzenia warsztatu badawczego wykorzystwała wiedzę i umiejętności zdobyte w czasie studiów oraz podczas licznych szkoleń. W przedstawionym dorobku daje się zauważyć konsekwencję w podnoszeniu kwalifikacji, podejmowaniu różnorodnych tematów i realizacji wielu zadań badawczych. Dzięki temu Habilitantka ugruntowała swoją pozycję w kilku zespołach badawczych. Jej zainteresowania w zakresie patomechanizmu choroby Alzheimera czy poszukiwania mechanizmu działania związków syntetycznych lub naturalnych rokuja nadzieję na dalszy, intensywny rozwój naukowy oraz realizację planów zdobycia środków finansowych na przeprowadzenie kolejnych badań.

3. Ocena cyklu publikacji wchodzących w skład habilitacyjnego osiągnięcia naukowego

3a. Ocena formalna

Pod względem formalnym w skład cyklu publikacji stanowiących podstawę postępowania habilitacyjnego pt. *Neurozapalenie w chorobie Alzheimera – badanie roli amyloidu- β i aktywności przeciwzapalnej nowych pochodnych 1,2-tiazyny w hodowlach komórek neuronopodobnych* wchodzi 5 prac opublikowanych w latach 2021-2022. W skład cyklu wchodzi 4 prace oryginalne oraz jedna praca przeglądowa, które ukazały się w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym znajdujące się na liście JCR, takich jak International Journal of Molecular Sciences (Q1 w kategorii Biochemistry & Molecular Biology), Molecular Neurobiology (Q1), Biomedicine & Pharmacotherapy (Q1 w kategorii Pharmacology & Pharmacy), Molecular Biology Reports (Q3 w kategorii Biochemistry & Molecular Biology) oraz Pharmacological Reports (Q2 w kategorii Pharmacology & Pharmacy). Zatem trzy spośród tych czasopism należą do I kwartyli (Q1) obejmującego czasopisma o najwyższym wskaźniku cytowań. Sumaryczny współczynnik oddziaływania IF publikacji wchodzących w skład cyklu habilitacyjnego wynosi 25,974, a

sumaryczna liczba punktów MEiN – 510. Wieloautorskie prace wchodzące w skład cyklu habilitacyjnego stanowią tematycznie spójny zbiór artykułów, w których dr Benita Wiatrak jest pierwszym autorem oraz autorem korespondującym. Opisy udziałów określające indywidualny wkład poszczególnych współautorów w ich powstanie zostały przedstawione w załączonych oświadczeniach. Na tej podstawie można stwierdzić istotną, wiodącą rolę Habilitantki w przygotowaniu publikacji wchodzących w skład cyklu. Jej zadania w trakcie realizacji tego projektu obejmowały: formułowanie problemów i celów badawczych, dobór metod badawczych, prowadzenie prac eksperymentalnych, opracowanie i analizę wyników, w tym analizę statystyczną, a także zarządzanie danymi, prace administracyjne związane z realizacją projektu, pisanie manuskryptów oraz korespondencję z wydawcami czasopism. Pod względem formalnym przedstawiony dorobek i osiągnięcie naukowe po uzyskaniu stopnia doktora zostały dobrze udokumentowane i nie budzą zastrzeżeń.

3b. Ocena merytoryczna

Choroby neurodegeneracyjne są wynikiem postępującego procesu zwyrodnienia komórek nerwowych prowadzącym do ich obumierania. W przebiegu tych schorzeń następują stopniowe i nieodwracalne zmiany w morfologii i funkcji neuronów, uszkodzenia szlaków sygnałowych, prowadzące do zaburzeń homeostazy. W przypadku choroby Alzheimera uszkodzenia neuronów oraz nagromadzenie zewnątrzkomórkowych, nierozpuszczalnych, fibrylarnych agregatów nieprawidłowych form β -amyloidu w postaci płytek starczych prowadzą do aktywacji mikrogleju i astrocytów. Amyloid β jest fragmentem białka prekursorowego APP (*amyloid precursor protein*), które jest wytwarzane przez neurony mózgowe, komórki naczyniowe i komórki krwi, a w mniejszym stopniu przez astrocyty. Sekretazy α i β hydrolizują APP, w wyniku czego powstają dwa rozpuszczalne N-końcowe produkty sAPP α i sAPP β . Uważa się, że w warunkach fizjologicznych, peptyd sAPP α pełni funkcje neurotropowe i neuroprotektcyjne, a sAPP β działa proapoptotycznie. Z kolei podwójna proteoliza APP przez β -sekretazę (enzym rozszczepiający β -APP-1; BACE1) w domenie zewnętrznej i γ -sekretazę w przestrzeniach wewnątrzblonowych generuje β -amyloid ($A\beta$). Szlak ten prowadzi do powstania różnorodnych fragmentów ($A\beta_{1-14}$, $A\beta_{1-15}$, $A\beta_{1-17}$, $A\beta_{25-35}$, $A\beta_{1-40}$, $A\beta_{1-42}$), które charakteryzują się różną zdolnością do formowania fibryli. Krótsze sekwencje, zwłaszcza 1 – 16, są pozbawione aminokwasów niezbędnych do formowania rdzenia amyloidogenego peptydu, co uniemożliwia proces fibrylacji. Natomiast reszty między aminokwasami 17 – 20 są niezbędne podczas fibrylogenezy. Dlatego właśnie fragmenty peptydu, takie jak $A\beta_{25-35}$, $A\beta_{1-40}$ oraz $A\beta_{1-42}$, są w szczególności przedmiotem wielu badań. Najbardziej amyloidogennym peptydem, któremu przypisuje się także neurotoksyczność, jest $A\beta_{1-42}$ wykazujący tendencję do tworzenia rozpuszczalnych oligomerów. Neurony, komórki mikrogleju czy astrocyty charakteryzują się znaczną zmiennością w formowaniu peptydów, co sugeruje, że w rozwoju choroby Alzheimera odgrywają rolę nie tylko neurony, ale także inne komórki. W warunkach fizjologicznych astrocyty odpowiadają za utrzymanie homeostazy jonowej, regulację potencjału energetycznego i statusu prooksydacyjno-antyoksydacyjnego neuronów, jak również biorą udział w tworzeniu bariery krew-mózg. Natomiast komórki mikrogleju kontrolują mikrośrodowisko tkanki poprzez usuwanie obumierających neuronów, a także poprzez odpowiedź immunologiczną. Narażenie komórek glejowych na ciągłą stymulację oraz zaburzenie mechanizmów kontroli procesu zapalnego może prowadzić do nasilonej degeneracji komórek nerwowych. W następstwie wytworzenia złogów amyloidowych następuje m.in. nadmierne wydzielanie cytokin prozapalnych (TNF- α , IL-1 β) oraz zwiększenie ekspresji indukowanej syntazy tlenku azotu (iNOS). Dlatego w ostatnim czasie wiele uwagi poświęca się procesowi neurozapalenia, które może leżeć u podstaw rozwoju choroby Alzheimera. W związku z tym zagadnienia poruszone w cyklu przez Habilitantkę wpisują się we współczesną tematykę badawczą.



WYDZIAŁ
FARMACEUTYCZNY
WUM

ul. Banacha 1a
02-097 Warszawa

www.farmakogenomika.wum.edu.pl

tel.: +48 22 57 20 735

faks: +48 22 57 20 735

katedrabiochemii@wum.edu.pl

Obecnie na świecie dotkniętych chorobą Alzheimera jest ok. 45 milionów osób, a liczba ta stale wzrasta, co stanowi istotny problem zdrowia publicznego. W Europie Zachodniej z powodu demencji cierpi ok. 2,5% osób w wieku 65–69 lat i ok. 40% osób w wieku 90–94 lat. Niestety szacuje się, że do 2050 r. liczba chorych w Europie Zachodniej wzrośnie do 18,9 mln, a w krajach Azji Wschodniej do 36,5 miliona, o czym dr Benita Wiatrak wspomniała we wprowadzeniu do cyklu. Do czynników ryzyka choroby Alzheimera zalicza się: zaawansowany wiek, mutacje genów presenilin, polimorfizm apolipoproteiny E, zmiany aktywności enzymów, takich jak: α -antychymotrypsyny czy butyrylocholinoesterazy. Patogeneza schorzenia wciąż nie jest w pełni poznana, dlatego opracowanie skutecznej terapii jest utrudnione i obecnie opiera się ona na leczeniu objawowym. Do leków najczęściej stosowanych w terapii choroby Alzheimera należą donepezyl, rywastygmina, galantamina z grupy inhibitorów acetylocholinesterazy oraz memantina jako antagonist receptoru NMDA (kwas N-metylo-D-asparaginowy). Niemniej jednak coraz częściej w leczeniu rozważa się stosowanie immunoterapii, której celem jest m.in. redukcja patologicznych uszkodzeń neuronów poprzez wytwarzanie przeciwciał anti- $A\beta$. Obecnie jednak wiele z tych leków jest jeszcze w toku badań klinicznych. Rozpatrywane są zarówno aktywne formy immunoterapii w postaci szczepionek, jak i bierna immunoterapia za pomocą przeciwciał anti- $A\beta$, takich jak crenezumab (faza II), gantenerumab (faza III), solanezumab (faza III) i BAN2401 (faza II). Niemniej jednak w przypadku niektórych – jak aducanumabu – próby kliniczne zakończyły się niepowodzeniem, o czym Habilitantka wspomniała we wprowadzeniu.

W swoim cyklu dr Benita Wiatrak skupiła się na badaniu roli fragmentów β -amyloidu, takich jak $A\beta_{25-35}$, $A\beta_{1-40}$ oraz $A\beta_{1-42}$ w zakresie stężeń 0,001-1 μ M, w warunkach symulowanego neurozapalenia *in vitro*. Badania te zostały przeprowadzone na liniach komórek neuronalnych i neuronopodobnych: i) PC-12 pochodzącej z guza chromochłonnego nadnerczy szczura, ii) SH-SY5Y pochodzącej z nerwiaka zarodkowego oraz iii) ludzkiej monocytowej linii komórkowej THP-1 pochodzącej z ostrej białaczki monocytowej, która była różnicowana do mikrogleju. Wszystkie wspomniane linie komórkowe są wykorzystywane w badaniach *in vitro* dotyczących choroby Alzheimera, przy czym jedynie SH-SY5Y jest neuronalną linią komórkową, natomiast linie PC-12 i THP-1 zaliczane są do nieneuronalnych linii komórkowych. Obecnie hodowle komórek nerwowych *in vitro* są powszechnie wykorzystywane w neurobiologii. Warto zaznaczyć, że linia komórkowa SH-SY5Y jest najczęściej stosowanym modelem, choć jej wadą jest zmniejszona wrażliwość na neurotoksyny czy substancje neuroprotektoryjne w porównaniu z pierwotnymi neuronami śródmózgowia. Coraz częściej w badaniach chorób neurodegeneracyjnych wykorzystuje się trójwymiarowe hodowle komórek nerwowych, otrzymane w procesie różnicowania komórek macierzystych lub nowotworowych linii komórkowych. W przedstawionym do oceny cyklu prac Habilitantka prowadziła badania na modelach 2D, które choć nie prezentują w pełni fizjologii tkanek, są często stosowanym i uznanym modelem badawczym. Niemniej jednak – co warto podkreślić – poprzez zróżnicowanie linii komórkowych oraz zastosowanie supernatantów z hodowli mikrogleju do stymulacji komórek PC-12 lub SH-SY5Y dr Wiatrak starała się odzwierciedlić mikrośrodowisko tkanki w ośrodkowym układzie nerwowym.

Jak dotąd większość badań $A\beta$ dotyczyła patologicznych skutków wysokiego poziomu tego białka, głównie upośledzenia funkcji poznawczych i choroby Alzheimera. Coraz częściej w literaturze wspomina się o jego metabolizmie komórkowym oraz fizjologicznej roli, choć nie została ona dotychczas w pełni poznana. Amyloid β w pikomolarnym stężeniu jest wykrywany w komórkach organizmu ludzkiego *in vivo*. W warunkach fizjologicznych występuje w płynach ciała w formie monomerów. Uważa się, że $A\beta$ w niskich stężeniach jest nietoksyczny. Prawdopodobnie dodatnio wpływa na plastyczność synaptyczną, a także na procesy związane z pamięcią. Inhibicja sekretazy i zablokowanie produkcji $A\beta$ prowadzi do śmierci neuronów. W



związku z tym redukcja $A\beta$ poniżej wartości fizjologicznych w czasie leczenia choroby Alzheimera może być przyczyną niepowodzeń terapeutycznych. Dlatego badania z zastosowaniem $A\beta$ w niskich stężeniach, które zostały uwzględnione w przedstawionym cyklu habilitacyjnym, wydają się być uzasadnione.

Przechodząc do szczegółowej oceny publikacji będących podstawą postępowania habilitacyjnego należy podkreślić, że jego tematyka wpisuje się we współczesne trendy wyjaśniania patomechanizmu choroby Alzheimera. Zbiór publikacji został poświęcony określeniu wpływu fragmentów amyloidu β na stres oksydacyjny i uszkodzenia DNA w komórkach neuronopodobnych w warunkach *in vitro*. W pierwszej publikacji z cyklu [H1] dr Benita Wiatrak przeprowadziła przegląd literatury dotyczącej zależności między chorobą Alzheimera a mikrobiomem jelitowym. W ostatnim czasie wiele uwagi poświęca się poszukiwaniu powiązań między składem bakteryjnym flory przewodu pokarmowego a chorobami neurologicznymi. Upośledzenie funkcji bariery jelitowej stanowi wrota dla drobnoustrojów, ich fragmentów lub produktów metabolizmu, co wpływa na funkcje układu immunologicznego, a w konsekwencji prowadzi do neurozapalenia. Stąd zjawisko to określa się mianem osi mikrobiota–jelito–mózg. W publikacji H1 dr Wiatrak opisała najczęściej stosowane metody leczenia choroby Alzheimera, zmiany mikroflory jelitowej u pacjentów cierpiących z powodu tego schorzenia, rolę neuroprzekazników, krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych i innych przekazników pochodzenia bakteryjnego czy zakażeń ogólnoustrojowych istotnych z punktu widzenia rozwoju choroby. W pracy tej zwrócono także uwagę na przepuszczalność bariery krew–mózg, która może być związana ze składem mikroflory jelitowej i produkcją krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych oraz na udział amyloidów bakteryjnych w tworzeniu płytek starczych. Niemniej istotnym elementem tej publikacji było omówienie procesu zapalnego w układzie nerwowym, a także roli diety i możliwości zastosowania probiotyków w terapii choroby Alzheimera. Praca H1 stanowi dobrze opracowane i wyczerpujące wprowadzenie do cyklu.

Jako szczegółowe cele badawcze prac oryginalnych w prezentowanym cyklu dr Benita Wiatrak wskazała:

- zbadanie działania $A\beta$ w niskich stężeniach w hodowlach komórek neuronopodobnych PC-12 oraz podobnych do mikrogleju THP-1 po stymulacji za pomocą lipopolisacharydu (LPS) [H2],
- zbadanie wpływu różnych fragmentów $A\beta$ w niskich stężeniach na markery stresu oksydacyjnego w hodowlach komórek neuronopodobnych PC-12 traktowanych LPS lub supernatantami pobranymi z hodowli komórek podobnych do mikrogleju THP-1 [H3],
- wyjaśnienie wpływu $A\beta_{1-40}$, $A\beta_{1-42}$ i $A\beta_{25-35}$ w niskich stężeniach na pęknięcia dwuniciowego DNA po aktywacji komórek przez NMDA [H4],
- zbadanie działania nowych trójpierścieniowych pochodnych 1,2-tiazyny w hodowlach komórek linii SH-SY5Y w warunkach symulowanego neurozapalenia oraz analiza *in silico* możliwości ich przenikania przez barierę krew–mózg [H5].

W publikacji H2 Habilitantka po raz pierwszy wskazała na potencjalną neurotroficzną rolę $A\beta_{25-35}$ w stężeniach 1 nM oraz 1 μ M. Peptyd ten we wskazanym zakresie stężeń nie wykazał działania toksycznego wobec komórek linii PC-12 i THP-1 zróżnicowanych odpowiednio za pomocą czynnika wzrostu nerwów (NGF) oraz 12-mirystylo-13-octanu forbolu (PMA). Natomiast redukował negatywne efekty wywołane przez LPS, tj. zmniejszał wewnątrzkomórkowy poziom reaktywnych form tlenu (ROS, test DCF-DA) oraz zmniejszał liczbę pęknięć w szybkim teście halo (FHA), w którym mierzono dyspersję chromatyny po stymulacji LPS. Ciekawą obserwacją był także wpływ $A\beta$ na zwiększenie średniej długości neurytów w hodowli PC-12 w porównaniu do hodowli inkubowanych tylko z LPS.



W publikacji H3 zostało wykazane działanie wybranych fragmentów β -amyloidu, tj. $A\beta_{1-40}$, $A\beta_{1-42}$ i $A\beta_{25-35}$, na enzymatyczne układy oksydoredukcyjne, takie jak katalaza, dysmutaza ponadtlenkowa (SOD), peroksydaza glutationowa (GPx)/glutation (GSH) po stymulacji za pomocą LPS. Najbardziej istotny efekt antyoksydacyjny oraz wpływ na aktywność SOD zaobserwowano w przypadku $A\beta_{1-40}$. Ponadto $A\beta_{1-40}$ w zakresie stężeń 0,001 – 1 μ M powodował wzrost poziomu GSH oraz współczynnika GSH/GSSG, których wartości były redukowane przez LPS. Inne badane fragmenty $A\beta$ wykazywały działanie bardziej zróżnicowane w zależności od stężenia. W badaniu tym Habilitantka zastosowała linie komórkowe SH-SY5Y oraz THP-1, które różnicowała za pomocą kwasu retinolowego i PMA. Warto przy tym podkreślić, że w badaniu tym poza LPS do symulacji stanu zapalnego w komórkach SH-SY5Y wykorzystano supernatanty pochodzące z hodowli komórek THP-1 podobnych do mikrogleju. Taki model *in vitro* jest sposobem na odzwierciedlenie mikrośrodowiska neuronalnego. Niemniej jednak obie linie komórkowe wymagają do hodowli innych mediów. Dlatego nasuwa się pytanie, w jakim stopniu supernatant z hodowli THP-1 zawierający medium RPMI-1640 może wpływać na proliferację komórek linii SH-SY5Y, jeśli w standardowych warunkach wymaga ona do hodowli mediów, takich jak EMEM lub medium MEM/F12. Niektóre składniki mediów hodowlanych, np. pirogronian sodu może zmniejszać toksyczność innych związków w hodowlach *in vitro* linii komórkowej SH-SY5Y. Częściowo odpowiedź na to pytanie została wskazana w publikacji H5, gdzie opisano proporcje supernatantu i medium wzrostowego zastosowane w eksperymentach.

W publikacji H4 dr Wiatrak poruszyła kwestię uszkodzeń dwuniciowego DNA po aktywacji komórek linii PC-12 przez NMDA. Amyloid β hamuje bowiem receptory NMDA, co przyczynia się do osłabienia połączeń synaptycznych. Wszystkie fragmenty $A\beta$, a zwłaszcza $A\beta_{1-42}$, w najwyższym badanym stężeniu 100 nM powodowały statystycznie istotny wzrost pęknięć podwójnej nici DNA w teście wykrywającym fosforylowane histony H2AX. Podobnie w przypadku aktywacji komórek za pomocą NMDA, poziom γ H2AX niezależnie od stężenia oraz czasu po podaniu NMDA był wyższy w hodowlach traktowanych $A\beta_{25-35}$ i $A\beta_{1-42}$. Ponadto fragmenty $A\beta$ obniżały ekspresję receptora NMDA1, choć efekt ten był zmienny w zależności od czasu.

Zwieńczeniem cyklu było badanie potencjalnego działania nowych trójpierścieniowych pochodnych 1,2-tiazyny [H5]. W pracy tej oceniony został ich wpływ na żywotność komórek SH-SY5Y, produkcję ROS oraz NO, a także na uszkodzenia DNA i aktywność cytochromu P450. Dzięki analizie statystycznej możliwe było wyselekcjonowanie związków o potencjalnie najsilniejszym efekcie neuroregeneracyjnym, tj. TP4 i TP8. Należy podkreślić, że w pracy tej zastosowane zostały techniki bioinformatyczne, które pozwoliły na predykcję przepuszczalności przez barierę krew-mózg, co stanowi istotny element poszukiwania związków o znaczeniu neurologicznym. Dodatkowym atutem było ustalenie parametrów systemu ADMET, dzięki czemu oceniono możliwe ścieżki metabolizmu tych związków przez izoformy cytochromu P450. Warto przy tym nadmienić, że związki trójcykliczne zawierające układ fenotiazyny lub azafenotiazyny są neuroleptykami, które ze względu na swoje właściwości są często stosowane w psychozach i schorzeniach psychiatrycznych. Jak dotąd stwierdzono w badaniach *in vivo*, że błękit metylenowy, który również jest pochodną tiazynową zapobiega pogorszeniu funkcji umysłowych. Związek ten hamuje powstawanie włókien zbudowanych z izoform białka tau. Dlatego poszukiwanie potencjalnych leków wśród pochodnych 1,2-tiazyny wydaje się być uzasadnione.

Podsumowując, przedstawiony cykl publikacji prezentuje nowatorskie podejście do patomechanizmu choroby Alzheimer, które w przyszłości może okazać się przełomowym. Niemniej jednak należy pamiętać, że badania *in vitro* tylko częściowo odzwierciedlają warunki *in vivo*. Dobór warunków i metod eksperymentalnych może zatem znacząco rzutować na uzyskane wyniki. W związku z tym wydaje się, że w przypadku oceny cytotoxyczności badanych

fragmentów $A\beta$, które są uznawane za potencjalnie neurotoksyczne w wyższych stężeniach, wskazane byłoby zastosowanie trzeciej metody weryfikującej toksyczność oraz wyznaczenie wartości IC_{50} jako miary cytotoksyczności związku w stosowanym modelu badawczym. W przeprowadzonych badaniach dr Wiatrak stosowała bowiem dwa znane testy oceny cytotoksyczności, tj. test MTT (bromek 3-(4,5-dimetylotiazol-2-yl)-2,5-difenylotetrazoliowy) oraz LDH (dehydrogenaza mleczanowa). Jak sama wspomniała $A\beta$ w teście MTT wpływa na przyspieszoną egzocytozę formazanu, co może prowadzić do wyników fałszywie dodatnich. Dlatego w pracy zastosowała dodatkową metodę weryfikacji w postaci testu LDH [H2]. Z kolei w publikacji H3 dr Wiatrak opisała modyfikację uznawaną za standardową metodę oceny żywotności komórek za pomocą MTT. Ponadto niezwykle istotnym elementem byłaby możliwość porównania wyników ze związkami wzorcowymi o znanym działaniu w układach komórkowych. W nawiązaniu do potencjalnej roli LPS w zaburzeniach osi mikrobiota-jelito mózg, Habilitantka we pracach H2 i H3 do stymulacji stosowała LPS lub supernatant z hodowli komórek THP-1. Natomiast w przypadku badań w warunkach *in vitro* warto rozważyć zastosowanie innych stymulatorów lub ich mieszaniny. Niektóre układy komórkowe, takie jak makrofagi czy komórki THP-1, wymagają dodatkowego czynnika sygnalizacyjnego – $IFN-\gamma$, które determinują sekrecję określonych czynników zapalnych, takich jak cytokiny lub ROS.

W ocenie osiągnięcia naukowego dr Wiatrak warto jednak zwrócić uwagę na fakt, że publikując prace w czasopismach z listy JCR już poddała się ocenie recenzentów tych czasopism. Publikacje te świadczą o wysokiej wartości merytorycznej prezentowanych rezultatów. Habilitantka poprzez swoje osiągnięcie wykazała umiejętność podjęcia i rozwijania tematu znajdującego zainteresowanie w międzynarodowym środowisku akademickim. Zaproponowane w osiągnięciu nowe pochodne 1,2-tiazyny jako potencjalne leki w terapii chorób neurologicznych są dodatkowym atutem potwierdzającym wkład Habilitantki w rozwój nauk farmaceutycznych. Nawiazywanie współpracy, poszerzanie zakresu stosowanych metod, zarządzanie projektem badawczym i prowadzenie korespondencji z redakcjami czasopism pozwalają stwierdzić, że dr Benita Wiatrak spełnienia wymagania potrzebne do uzyskania samodzielności naukowej.

4. Ocena działalności dydaktycznej, organizacyjnej oraz popularyzującej naukę

Od 2014 r. dr Benita Wiatrak prowadzi zajęcia dydaktyczne na Wydziale Lekarskim oraz Wydziale Farmaceutycznym Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu. Należy przy tym podkreślić, że obejmują one szeroki zakres tematyczny, począwszy od zajęć seminaryjnych z „Chirurgii eksperymentalnej i biomateriałów” przez zajęcia z Anatomii, Fizjologii i Patofizjologii, po zajęcia fakultatywne nt. „Produktów leczniczych terapii zaawansowanej”. Od 2020 r. Pani dr prowadzi zajęcia z Farmakologii oraz Farmakodynamiki. Nie ulega wątpliwości, że dzięki temu zdobyła bogate doświadczenie dydaktyczne. Dodatkowo Habilitantka była zaangażowana w prowadzenie ćwiczeń specjalistycznych, których efektem jest łącznie osiem prac magisterskich na Wydziale Farmaceutycznym oraz Wydziale Lekarskim. W pięciu z nich Pani dr pełniła funkcję promotora. Zwieńczeniem trzech prac magisterskich są publikacje naukowe, co stanowi dodatkowe potwierdzenie zaangażowania Habilitantki w proces kształcenia młodej kadry naukowej oraz w inicjowanie i rozwój działalności naukowej studentów.

Obecnie dr Wiatrak pełni funkcję promotora pomocniczego w przewodzie doktorskim pana Michała Tyliszczaka. Temat projektu *Ocena neuroprotektynowego i neuroregeneracyjnego działania bakterii probiotycznych izolowanych z tradycyjnych produktów organicznych w modelu in vitro choroby Alzheimera* wpisuje się w dotychczasową tematykę prac badawczych Habilitantki. Praca powstaje pod opieką promotora prof. dr. hab. Tomasza Sozańskiego.

Zadanie kształcenia młodej kadry naukowej dr Wiatrak realizowała także poprzez sprawowanie opieki nad studenckim kołem naukowym. W latach 2018-2020 pełniła funkcję współopiekuna Studenckiego Koła Naukowego Cytometrii Przepływowej i Badań Biomedycznych. W tym czasie angażowała się w organizację spotkań naukowych oraz zachęcanie młodych naukowców do udziału w studenckich konferencjach naukowych. W ramach tej działalności brała również udział w organizacji warsztatów, promujących zawód diagnosty laboratoryjnego, dla uczniów szkół ponadpodstawowych. Dr Wiatrak kilkakrotnie brała udział w organizacji Dolnośląskiego Festiwalu Nauki. W ramach działalności popularyzującej naukę prowadziła warsztaty dotyczące terapii zespołu metabolicznego i terapii komórkowej, rozwoju stanu zapalnego oraz biologii molekularnej. W czasie Światowego Tygodnia Mózgu uczestniczyła w akcji popularyzującej wiedzę nt. funkcjonowania mózgu. Na uwagę zasługuje też działalność prospołeczna dr Wiatrak na rzecz osób z niepełnosprawnościami w środowisku naukowym. Przez kilka lat Pani dr była członkiem stowarzyszenia „Twoje Nowe Możliwości” oraz Zrzeszenia Studentów Niepełnosprawnych Akademii Górniczo-Hutniczej. W tym czasie realizowała zadania z zakresu motywowania studentów z niepełnosprawnościami. Wyrazem tej aktywności są także artykuły w Krakowskim Semestralniku Studentów Niepełnosprawnych.

Dr Benita Wiatrak kilkakrotnie organizowała warsztaty dla pracowników Izerskiego Centrum Pulmonologii i Chemioterapii „IZER-MED” dotyczące postępowania z materiałem histopatologicznym i cytologicznym. Pani dr nawiązała także współpracę z sektorem gospodarczym. W zakresie wykorzystania produktów pochodzenia naturalnego w medycynie i weterynarii współpracuje z irlandzką firmą biotechnologiczną Cellnutrition Health. W ramach tej współpracy zajmuje się oceną wpływu produktu (CELLMAR) na komórki macierzyste szpiku kostnego.

Jest członkiem trzech towarzystw naukowych, takich jak Polskie Towarzystwo Farmakologiczne, Europejski Związek Towarzystw Farmakologicznych EPHAR, Międzynarodowa Unia Farmakologii Podstawowej i Klinicznej IUPHAR. Swoją aktywność w Polskim Towarzystwie Farmakologicznym dr Wiatrak zaznaczyła poprzez wygłoszenie wykładu nt. neuroprotektynowego i neuroregeneracyjnego działania polifenoli w hodowlach komórkowych w modelu neurodegeneracji typu Alzheimer.

Jako współedytor uczestniczyła w wydaniu zeszytu specjalnego „Osteoporosis and other bone tissue disorders” w czasopiśmie International Journal of Environmental Research and Public Health. Ponadto pełni funkcję „Review Editor” w czasopiśmie Frontiers in Natural Products oraz była członkiem rady naukowej jednego z numerów (1/2021) czasopisma Acta of Dental Bioengineering and Biomaterials. Jak dotąd była recenzentem 18 artykułów w 16 czasopismach o zasięgu międzynarodowym.

W ramach działalności organizacyjnej na rzecz Uczelni, dr Benita Wiatrak bierze udział w pracach Komisji Rekrutacyjnej Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu. Od 2022 r. jest także członkiem Międzywydziałowego Zespołu ds. Dobrostanu Zwierząt, przy Centrum Badań Przedklinicznych Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu.

Habilitantka wielokrotnie była wyróżniana nagrodami Rektora Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu zarówno indywidualnymi, jak i zespołowymi. W sumie od 2020 r. zdobyła ich 18, co świadczy o znacznym zaangażowaniu Habilitantki w rozwój Jednostki macierzystej, co spotyka się z uznaniem Władz Rektorskich.

W związku z powyższym stwierdzam, że aktywność dr Wiatrak dalece wykracza poza ramy działalności naukowej. Udział w kształceniu młodej kadry, nawiązywanie współpracy z sektorem

gospodarczym oraz zaangażowanie w sprawy organizacyjne jednostki macierzystej świadczy o jej dojrzałości i samodzielności naukowo-organizacyjnej.

5. Wnioski końcowe

Osiągnięcie w postaci cyklu publikacji oraz całokształt dorobku naukowego dr Benity Wiatrak pod względem formalnym i merytorycznym oceniam pozytywnie. Jej udział w powstaniu cyklu, obejmujący wybór tematyki badawczej, wykonanie zadań, zarządzanie projektem oraz zaangażowanie w proces publikacyjny należy uznać za wiodący. Biorąc pod uwagę dorobek naukowy dr Benity Wiatrak po uzyskaniu stopnia doktora, przedstawione osiągnięcie naukowe w postaci cyklu publikacji oraz udział w pracach dydaktycznych i organizacyjnych stwierdzam, że spełniają one kryteria określone w art. 219 ust. 1 pkt 2 Ustawy Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce z 20 lipca 2018 r. (Dz. U. z 2018 r. poz. 1668 z późn. zm.) dotyczące nadania stopnia doktora habilitowanego. Na tej podstawie przedstawiam Radzie Dyscypliny Nauki Farmaceutyczne Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu poparcie dla wniosku dr Benity Wiatrak o uzyskanie stopnia doktora habilitowanego w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu, w dyscyplinie nauki farmaceutyczne.

Warszawski Uniwersytet Medyczny
Katedra i Zakład Biochemii i Farmakogenomiki



dr hab. n. farm. Monika Czerwińska