

Prof. dr hab. Bożena Kamińska-Kaczmarek
Pracownia Neurobiologii Molekularnej
Tel. +48 22 5892209
Email: b.kaminska@nencki.edu.pl

Warszawa, 18.12. 2023

Ocena osiągnięcia naukowego, osiągnięć naukowo-badawczych i aktywności naukowej oraz dorobku dydaktycznego i popularyzatorskiego doktora Aleksandry Rutkowskiej **pt.:" Badanie nowych potencjalnych celów terapeutycznych i ich zastosowanie w procesie odbudowy mieliny oraz terapii stwardnienia rozsianego"** w związku z postępowaniem w sprawie nadania stopnia doktora habilitowanego

Ocena formalna

Jako osiągnięcie naukowe rozprawy habilitacyjnej pod tytułem „**Badanie nowych potencjalnych celów terapeutycznych i ich zastosowanie w procesie odbudowy mieliny oraz terapii stwardnienia rozsianego**” zgłoszono cykl 4 zbliżonych tematycznie, oryginalnych artykułów naukowych opublikowanych w czasopismach o zasięgu międzynarodowym w latach 2021-2022. We wszystkich tych pracach dr Rutkowska jest autorem korespondencyjnym, a jej wkład został bardzo precyzyjnie określony i obejmował: stawianie hipotez badawczych i tworzenie koncepcji zaplanowanych badań, zdobycie finansowania, jak też udział w wykonaniu badań, analizie danych i interpretacji wyników oraz w przygotowaniu manuskryptów. Prace wchodzące w skład osiągnięcia powstały po zakończeniu stażu podoktorskiego w Irlandii i po podjęciu pracy na Gdańskim Uniwersytecie Medycznym.

Otrzymane materiały są kompletne i zawierają 1) autoreferat; 2) informację o przebiegu kariery, dorobku naukowym, dydaktycznym, wdrożeniowym i popularyzatorskim; 3) wykaz opublikowanych przez Kandydata prac oraz oświadczenia współautorów określających swoją rolę w wieloautorskich publikacjach. Przedstawione materiały są kompletne i spełniają wymogi formalne określone w ustawie z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach i tytułach naukowych. Wiodący udział dr Rutkowskiej w zgłoszonych publikacjach jak i załączone oświadczenia współautorów, definiują jednoznacznie jej wiodący udział w przygotowaniu publikacji.

Dr. Rutkowska ma za sobą międzynarodową karierę, podczas której zdobywała umiejętności w prestiżowych instytucjach naukowych oraz w firmie Novartis. W 2008 r. dr Rutkowska uzyskała licencjat z wyróżnieniem (Bachelor of Arts Hons) w dziedzinie psychologii nadany przez Higher Education and Training Awards Council w Dublin Business School w Republice Irlandii. Co ciekawe, w 2010 r. – obroniła pracę magisterską pt. *“An investigation of the relationship between the constructs of depression and vital exhaustion in cardiac patients”* (Badanie związku między konstruktami depresji i wyczerpaniem życiowym u pacjentów kardiologicznych) i uzyskała tytuł M.sc. ze specjalizacją w stosowanych metodach badań społecznych, a w 2011 r. obroniła kolejną pracę magisterską pt. *“The potential of S1P agonists to reduce LPS-induced cellular stress in microglia”* (Potencjał agonistów S1P w zmniejszaniu stresu komórkowego wywołanego przez LPS w mikrogleju) uzyskując tytuł M.sc. ze specjalizacją z neuronauk, oba tytuły nadane przez Trinity College Dublin, Republika Irlandii.

W latach 10.2011- 09.2014 była doktorantem w Novartis Institute for Biomedical Research, Novartis Pharmaceuticals w Bazylei w Szwajcarii oraz w Katedrze Fizjologii, Wydziału Medycznego, Trinity College Dublin, Republika Irlandii. W 2015 r. na podstawie pracy doktorskiej pt. *“The Signalling and Function of EB12 in the Central Nervous System”* (Sygnalizacja oraz funkcja EB12 w ośrodkowym układzie nerwowym) uzyskała tytuł doktora nadany przez Wydział Medyczny Trinity College Dublin w Republice Irlandii.

W okresie 11.2014 – 12.2015 odbyła staż podoktorski na Wydziale Medycznym, Katedry Gerontologii Medycznej, Trinity College Dublin. Uczestniczyła jako postdoc w projekcie BiomarkAPD (ang. Biomarkers for Alzheimer's and Parkinson's disease) finansowanym w programie JPND (EU Joint Programme – Neurodegenerative Diseases) realizowanym w St. James's Hospital Trinity College Dublin pod opieką Profesora Briana Lawlora. W tym projekcie zajmowała się walidacją biomarkerów w płynie mózgowo-rdzeniowym w diagnostyce otępienia.

W trakcie studiów i staży w zagranicznych, prestiżowych instytucjach dr A. Rutkowska osiągnęła duży sukces naukowy publikując szereg znaczących prac, które zostały wysoko ocenione przez środowisko naukowe. Po stażu podoktorskim wróciła do Polski w ramach otrzymanego grantu POLONEZ 2 z Narodowego Centrum Nauki (NCN), w którym była kierownikiem, by kontynuować badania nad rolą EBI2/7 α ,25-OHC w procesach mielinizacji na Gdańskim Uniwersytecie Medycznym. Od 03.2016 – 03.2019 była adiunktem w Zakładzie Medycyny Laboratoryjnej, Wydziału Lekarskiego Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, a od 04.2020 jest adiunktem w Zakładzie Anatomii i Neurobiologii tego Wydziału. Podjęła się dodatkowych obowiązków zostając z-cą Kierownika Badań w Centrum Chorób Mózgu oraz specjalistą ds. inicjatywy "Science Speed Dating" (2022).

Ocena merytoryczna

Ocena osiągnięć naukowo-badawczych i aktywności naukowej

Autoreferat dr Rutkowskiej w syntetycznej i ciekawej formie przedstawia omówienie prac stanowiących podstawę osiągnięcia naukowego w szerokim kontekście nagromadzonej wiedzy na ten temat. Jest to ciekawa lektura, będąca kompetentnym i autorskim przedstawieniem zagadnienia będącego przedmiotem zainteresowania w świecie biologów i klinicystów. Zgłoszony do oceny cykl 4 prac opublikowanych w latach 2021-2022 stanowi spójny tematycznie cykl oryginalnych prac dotyczący ekspresji receptora EBI2 i jego naturalnego liganda oksysterol 7 α ,25-OHC w ludzkich oligodendrocytach oraz roli tego szlaku przekazywania w procesie regeneracji mieliny. Podjęta problematyka jest bardzo ważna, gdyż molekularne mechanizmy remielinizacji poza aspektem czysto poznawczym mają ogromne znaczenie w opracowywaniu potencjalnych terapii naprawczych rdzenia kręgowego. Stanowi też kontynuację ścieżek badawczych realizowanych w trakcie doktoratu i stażu podoktorskiego. Dr Rutkowska wykazała poprzednio, że receptor EBI2 występuje w komórkach ośrodkowego układu nerwowego (OUN) takich jak astrocyty, w których reguluje uwalnianie cytokin prozapalnych, chemotaksję i chroni przed chemicznie indukowaną demielinizacją w skrawkach organotypowych mózdzku (Rutkowska et al., 2015, 2016, 2017, 2018). Deregulacja poziomu EBI2 jak i jego ligandu występuje w chorobach autoimmunologicznych i neurodegeneracyjnych. Rola receptora EBI2 była badana w mysich i ludzkich astrocytach, mysim modelu SM - eksperymentalnym autoimmunizacyjnym zapaleniu rdzenia kręgowego i mózgu (EAE) oraz w stwardnieniu rozsianym (SM).

Celem pracy nr. 1 (Maria Velasco-Estevez et al., IJMS 2021) było przeprowadzenie analizy ekspresji oraz funkcji receptora EBI2 oraz enzymów odpowiedzialnych za produkcję oksysterolu 7 α ,25-OHC, jego liganda w PDGFR+ progenitorach oligodendrocytów (oligodendrocyte progenitor cells, OPC) i MBP+ dojrzałych oligodendrocytach w ludzkim mózgu. Zmiany w ekspresji EBI2 podczas dojrzewania oligodendrocytów i jego właściwości chemotaktyczne zbadano wykorzystując ludzką linię oligodendrocytów MO3.13. Ekspresja EBI2 była indukowana w oligodendrocytach MO3.13 podczas dojrzewania indukowanego PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate, ang.), a podanie ligandu (oksysterolu 7 α ,25-OHC) lub antagonisty receptora EBI2 (NIBR189), hamowały przejściowy wzrost ekspresji EBI2, ale

nie blokowały ich dojrzewania oligodendrocytów i prawidłowego przebiegu mielinizacji. Aktywacja receptora EB12 przez oksysterol $7\alpha,25\text{-OHC}$ prowadziła do zwiększenia chemotaksji oligodendrocytów MO3.13. Wykazano istotną rolę EB12 w odbudowie mieliny w następstwie demielinizacji indukowanej lizofosfatydylocholiną (LPC) w skrawkach organotypowych mózdku. Blokowanie receptora EB12 antagonistą NIBR189 zahamowało endogenne procesy odbudowy mieliny. Przeprowadzono też badania z wykorzystaniem skrawków pacjentów z SM i wykazano nie tylko wzrost liczby EB12+ komórek w miejscach uszkodzenia, ale także obecność EB12 w astrocytach i mikrogleju.

W pracy Klejbor et al. Eur J Neurosci. 2021 (praca nr. 2) wykorzystano model SM, w którym demielinizację indukowano dietą z 0,2% kuprizonem w karmie przez 5 tygodni u myszy kontrolnych i pozbawionych genu *EB12* (EB12 KO). W modelu tym po zaprzestaniu podawania kuprizonu dochodzi do remielinizacji w ciągu 14 dni. U myszy EB12 KO stwierdzono zaburzoną remielinizację, zmniejszoną utratę oligodendrocytów, mniej astrocytów i podwyższony poziom cholesterolu całkowitego u myszy EB12 KO. po wyzdrowieniu. Ekspresja mRNA kodujących cytokiny prozapalne była na porównywalnym poziomie u myszy typu WT i EB12 KO, z jedynie niewielkimi różnicami w poziomach *tnfa* i *il1b*. Ekspresja czynników związanych z zapaleniem, kinazy Abl1 i podjednostki NFKB1 (p105/p50) była znacząco obniżona u myszy EB12 KO. Wyniki w tej pracy są ogólnie przekonujące, chociaż brakuje komentarza, gdy poziomy mRNA i białka cytokin się nie pokrywają w fazie odbudowy (recovery). Poziom mRNA nie zawsze przekłada się na poziomy białka, a w przypadku cytokin, gdy dochodzi proces aktywacji przez proteolizę, jest to jeszcze bardziej spekulatywne. Moje zastrzeżenie budzi też komentarz w podpisie do fig. 3: (b) *EB12 receptor transcripts increased during recovery from cuprizone intoxication (196% ± 8% vs. peak). One-way ANOVA and Tukey's multiple comparison test (p < 0.02), N = 2 mice per treatment, *p < 0.05*. Jak można policzyć statystyką mając 2 myszy na warunek? Podobnie w fig.3c, n=2 w grupie EB12KO recovery.

Kolejna praca (Velasco-Estevez et al., Front Cell Neurosci 2022, praca nr.3) zawiera wyniki uzyskane w ramach grantu POLONEZ 2 i obejmuje badania nad funkcją kanału jonowego Piezo1 w oligodendrocytach i SM. Przesłanką do podjęcia badań były obserwacje, że oligodendrocyty tworzą mielinę wokół nanowłókien polistyrenowych o wielkości podobnej do aksonów i że mechaniczne sygnały są niezbędne do różnicowania progenitorów w tworzące mielinę oligodendrocyty. Dr Rutkowska zbadała ekspresję genu *Piezo1* w OPC, dojrzałych oligodendrocytach oraz w osłonkach mielinowych w ludzkim mózgu. Wykazała, że ekspresja *Piezo1* w oligodendrocytach stopniowo maleje w miarę dojrzewania tych komórek. W istocie białej u pacjentów z SM wykryto obniżoną ekspresję *Piezo1* w porównaniu do osób zdrowych. Wyniki badań komórkowych wskazują na aktywację receptora Piezo1 przez agonistę Yoda-1, co prowadzi do uwalniania wewnątrzkomórkowych jonów wapnia. Używając inhibitora Piezo1 (GsMTx4) oraz agonisty (Yoda-1) wykazano, że blokowanie Piezo1 indukuje migrację i proliferację, a aktywacja tego kanału je hamuje. Farmakologiczna modulacja wewnątrzkomórkowych szlaków sygnałowych kontrolowanych przez Piezo1 wskazuje na możliwości jej wykorzystania jako terapii stymulującej odbudowę mieliny w warunkach patofizjologicznych np. w SM, czyniąc tym samym kanał jonowy Piezo1 nowym celem terapeutycznym do odbudowy mieliny w OUN.

Równie ciekawa i oryginalna jest tematyka pracy Kutryb-Zajac et al., Frontiers in Neuroscience 2022 (praca nr.4), w której zbadano rozmieszczenie i aktywności izoenzymów deaminazy adenylozynowej 1/2 (ADA1/2) w płynie mózgowo-rdzeniowym i krwi osób chorych na SM, a także in vitro w komórkach endotelialnych naczyń włosowatych mózgu, astrocytach i perycytach. Założenie pracy było iż modyfikacja aktywności enzymów w naczyniach krwionośnych może potencjalnie ograniczać infiltrację komórek w przypadku chorób zapalnych OUN, takich jak SM, i stanowi obiecujący cel terapeutyczny dla leków.

Doświadczenia *in vitro* przeprowadzono na nieśmiertelnionych ludzkich komórkach endotelialnych naczyń włosowatych mózgu, ludzkich perycytach z naczyń krwionośnych mózgu oraz ludzkich astrocytach (uzyskanych od prof. Tomomiego Furihaty z Tokyo University of Pharmacy and Life Sciences w Japonii). Do wykrycia aktywności ADA1 i ADA2 wykorzystano test enzymatyczny po analizie HPLC, który wykazał zwiększony stosunek ADA1 do ADA2 zarówno w osoczu, jak i w płynie mózgowo-rdzeniowym pacjentów z SM. Aktywność ADA1 w osoczu była znacząco indukowana w SM, podczas gdy ADA2 była nieistotnie obniżona w płynie mózgowo-rdzeniowym. Astrocyty, perycyty i komórki śródbłonna mózgu wykazały na swojej powierzchni aktywność ADA1, której podstawowy poziom był pięciokrotnie wyższy w komórkach śródbłonna niż w pozostałych komórkach. Aktywność ADA2 wykryto w perycytach i komórkach śródbłonna. Stymulacja komórek cytokinami prozapalnymi TNF α /IL17 zmniejszyła wewnątrzkomórkowe poziomy nukleotydów tylko w perycytach. Traktowanie TNF α /IL17 nie modulowało hydrolizy ATP i AMP na powierzchni komórki ani deaminacji adenozyiny w perycytach i astrocytach, ale zmniejszyła hydrolizę AMP i aktywność ADA2 oraz zwiększało poziom ADA1 w komórkach śródbłonna. Odzwierciedla to wzór izoenzymu ADA widoczny w płynie mózgowo-rdzeniowym pacjentów z SM. Zdaniem dr Rutkowskiej zwiększony stosunek ADA1 do ADA2 u osób chorych na SM może przekładać się na niekorzystny fenotyp wyzwalający mechanizmy prozapalne, w których pośredniczy ADA1 i zmniejszający działanie neuroprotektoryjne i pobudzające wzrost zależne od ADA2.

Prace dr. Rutkowskiej wyróżniają się podejmowaniem ważnych tematów i konsekwentnym realizowaniem dobrze zaplanowanych badań, opracowywaniem ich w oryginalny sposób, ale także szerokim zakresem używanych, nowoczesnych metod, zastosowaniem zwierzęcych modeli badawczych i zaawansowaną analizą próbek ludzkich z SM. Tym co szczególnie odróżnia te prace od licznych prac pokazujących profile ekspresji w jakiejś patologii, jest udana analiza mechanizmów regulacji i znaczenia tych procesów z wykorzystaniem szerokiego wachlarza metod i modeli badawczych.

Zarówno prace włączone do rozprawy habilitacyjnej jak i przedstawiony dorobek naukowy jest bardzo dobry, uzyskane wyniki w pewnych aspektach pionierskie i przyczyniające się do poznania ważnych etapów remielinizacji. Efektem pracy doktorskiej były 4 pierwszoautorskie publikacje doświadczalne i 1 przeglądowa opublikowane w prestiżowych czasopismach (takie jak *Glia*, *J Neuroinflamm.*, *Neuropharmacol.*). Wszystkie prace dr Rutkowskiej są metodycznie dość złożone, wykorzystują właściwe modele *in vitro* i *in vivo*, a wyniki są elegancko i ciekawie przedstawione. Prace zostały opublikowane w prestiżowych czasopismach. Ocena naukometryczna (cytowania i współczynnik oddziaływania czasopism) pokazuje, że prace wskazane w rozprawie i inne prace, w których przygotowaniu uczestniczyła dr Rutkowska, wzbudziły zainteresowanie środowiska naukowego i były cytowane 251 razy (WoS), a indeks Hirscha wynosi 9. Nie mam wątpliwości, że wyniki cytowalności się poprawią biorąc pod uwagę wagę i jakość prac. Na podkreślenie zasługuje fakt, że ten bardzo dobry dorobek został uzyskany mimo 3 urlopów macierzyńskich, co pokazuje że dr Rutkowska bardzo dobrze łączy na dużą aktywność zawodową z macierzyństwem.

Za swoją aktywność naukową dr Rutkowska uzyskała kilka nagród, wśród których są Nagroda Specjalna Rektora Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego za publikację: pt. „EBI2 is temporarily upregulated in MO3.13 oligodendrocytes during maturation and regulates remyelination in the organotypic cerebellar slice model” *Int. J. Mol. Sci.*, 2021 oraz Nominacja do Polskiej Nagrody Inteligentnego Rozwoju 2020 w kategorii Naukowiec przyszłości za realizację projektu pt.: „Szlaki sygnałowe receptora EBI2/oksysterolu w patofizjologii, terapii oraz diagnostyce stwardnienia rozsianego.”

Ocena działalności organizacyjnej

Dr Aleksandra Rutkowska jest beneficjentem kilku grantów. Po powrocie do Polski została Kierownikiem projektu Polonez. W grudniu 2019 roku otrzymała grant OPUS (NCN) pt. „Szlaki sygnałowe receptora EB12/oksysterolu w patofizjologii, terapii oraz diagnostyce stwardnienia rozsianego”. W grudniu 2019 roku otrzymała grant OPUS (NCN) pt. „Szlaki sygnałowe receptora EB12/oksysterolu w patofizjologii, terapii oraz diagnostyce stwardnienia rozsianego”. Bazując na wynikach uzyskanych zarówno podczas doktoratu jak i w ramach grantu POLONEZ 2, w maju 2023 uzyskała kolejny grant z NCN w konkursie SONATA 18 (nr.rej. 2022/47/D/NZ3/02613). Jako kierownik tego projektu będzie kontynuować badania nad rolą EB12 w odbudowie mieliny w komórkach glejowych z myszy kontrolnych i EB12 KO oraz testować odpowiednio zmodyfikowany oksysterol $7\alpha,25\text{-OHC}$ w demielinizacji indukowanej przez kuprizon. Dr Rutkowska w 2023 roku zainicjowała i została koordynatorem konsorcjum międzynarodowego i projektu pt. „Dementia and Myelination: Uncovering the Role of Myelination in the Pathogenesis and Progression of Alzheimer’s and Parkinson’s disease” złożonym w konkursie JPND. W marcu 2023 dr Rutkowska przygotowała projekt pt. „Ocena toksyczności ostrej i przewlekłej zmodyfikowanego oksysterolu CF3- $7\alpha,25\text{OHC}$ i barbadyny in vivo”, który otrzymał finansowanie w ramach programu "Inicjatywa Doskonałości – Uczelnia Badawcza" (IDUB) dla działania Inkubator GUMed. Obecnie kieruje ona sześciuosobowym zespołem składającym się z trzech doktorantów, pracownika naukowo-technicznego oraz dwóch magistrantów.

Dr Rutkowska nawiązała współpracę z innymi badaczami z Japonii i Hiszpanii. Wszystkie wymienione elementy wskazują na dobre rozpoznanie i docenianie jej aktywności naukowej.

Ocena działalności dydaktycznej

Dr Rutkowska ma doświadczenie w działalności dydaktycznej: jest promotorem pomocniczym 3 prac doktorskich realizowanych w ramach kierowanych projektów badawczych finansowanych ze środków zewnętrznych (NCN). Była też aktywnie zaangażowana w opiekę nad doktorantami, stażystami medycznymi i młodymi kadrami naukowymi. Opiekowała się dr M. Velasco-Estevéz, obecnie ma też kilku stażystów pod swoją opieką.

Uczestniczyła w promocji nauki na festiwalach nauki i piknikach naukowych, prowadziła promocję nauki i programów stypendialnych w szkołach.

Podsumowując, dr Aleksandra Rutkowska jest samodzielnym uczonym, kierownikiem własnych, prestiżowych grantów w Polsce. Ma doświadczenie jako mentorka. Ogólnie oceniam jej aktywność dydaktyczną jako znaczącą i pozytywną.

Podsumowanie i wniosek końcowy

Na podstawie oceny dokumentacji szczególnego osiągnięcia naukowego (w znaczeniu artykułu 16.2 ustawy), osiągnięć naukowo-badawczych, dorobku dydaktycznego oraz współpracy międzynarodowej, stanowiących podstawę postępowania o nadanie stopnia naukowego doktora habilitowanego, **oceniam bardzo wysoko całość dorobku naukowego dr Aleksandry Rutkowskiej**. Cykl 4 publikacji zgłoszony jako rozprawa stanowi oryginalny, nowatorski i bardzo ważny wkład do naszej wiedzy i do rozwoju nauki. Wszystkie zgłoszone prace są interdyscyplinarne, wielometodyczne i wysokiej jakości naukowej. Prace te zostały zauważone przez środowisko naukowe. Wyniki badań dr Rutkowskiej mają też znaczenie praktyczne, gdyż dostarczają istotnych informacji co do nowych cząsteczek, które mogą być potencjalnie wykorzystane w diagnostyce i być może w terapii SM. Widać, że jest naukowcem z wizją naukową,

umiejącym definiować ważne problemy biologiczne i je inteligentnie rozwiązać. Jest samodzielną uczoną, kierownikiem własnych projektów badawczych i opiekunem młodszych naukowców.

Całościowy dorobek **dr Aleksandry Rutkowskiej** stanowi bardzo znaczący wkład do rozwoju nauki i w pełni odpowiada kryteriom stawianym przy ubieganiu się o stopień doktora habilitowanego określonym w ustawie z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach i tytułach naukowych. **Z wyżej wymienionych powodów rekomenduję Radzie Dyscypliny Biotechnologia Uniwersytetu Gdańskiego wsparcie wniosku o nadanie dr Aleksandrze Rutkowskiej stopnia doktora habilitowanego.**

Z poważaniem