

Warszawa, 09.02.2023r.

Prof. dr hab. Lidia Strużyńska
Tel: 22-608 65 76
e-mail: lidkas@imdik.pan.pl

Ocena rozprawy doktorskiej

Pani mgr Karoliny Nizińskiej-Smolińskiej
p.t. „Rola białka Mbd3 w procesie epileptogenezy”

wykonanej w Pracowni Epileptogenezy Instytutu Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego PAN, pod kierunkiem Promotora, Pani Prof. dr hab. Katarzyny Łukasiuk

Ocena formalna

Oceniana dysertacja została opracowana w formie klasycznej składającej się ze zwyczajowo przyjętych rozdziałów: Wstęp, Cele i założenia pracy, Materiały i Metody, Wyniki, Dyskusja, Podsumowanie, Wnioski i Piśmiennictwo. Ponadto, dołączono wykaz najważniejszych skrótów, streszczenia w języku polskim i angielskim oraz materiały dodatkowe zawierające pełne listy genów o ekspresji zmienionej w warunkach eksperymentalnych opisanych w doktoracie. Rozprawa liczy 168 stron tekstu wzbogaconego w liczne ryciny, tabele oraz materiał graficzny z badań mikroskopowych i immunobloty. Konstrukcja pracy jest zgodna z obowiązującymi wymogami ustawowymi dla oryginalnej rozprawy doktorskiej.

W pracy wskazano źródło finansowania badań - grant NCN OPUS 2015/19/B/NZ4/01401 zatytułowany „Rola MBD3 (*methyl-binding protein 3*) w epileptogenezy”.

Według informacji zawartej w rozdziale Materiały i metody, procedury eksperymentalne przeprowadzone na zwierzętach uzyskały zgodę I Lokalnej Komisji Etycznej do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach w Warszawie (uchwały nr 357/2017, 395/2017 oraz 838/2019).

Chcę podkreślić, że praca jest przygotowana bardzo starannie pod względem językowym, graficznym i redakcyjnym.

Ocena merytoryczna

Padaczka jest chorobą, która towarzyszy człowiekowi od zarania dziejów. Pierwsze wzmianki o niej pochodzą z najstarszych pism naszej cywilizacji - babilońskich, egipskich i perskich. Przez stulecia choroba ta budziła niepokój, uważana była za klątwę, karę i dowód opętania, a chorzy na nią byli skazywani na nietypowe metody leczenia, (żeby wspomnieć tu

choćby egzorcyzmy czy upuszczanie krwi), z których wiele stosowano jeszcze w początkach XIX w.

Dziś w leczeniu padaczki dostępny jest cały wachlarz farmaceutyków, lecz mimo to wciąż poznajemy nowe mechanizmy tej patologii i zmagamy się z lekoopornymi postaciami tej choroby. Wiemy, że zmiany na poziomie komórkowym i molekularnym zachodzące w przebiegu epilepsji i procesu epileptogenezy są wieloczynnikowe i dotyczą aktywności układów neuroprzekaźnikowych, funkcji receptorów i kanałów, czynników wzrostowych i zapalnych oraz ekspresji genów.

Choć rozwój nauki i medycyny zdjął odium tajemniczości z tej jednej z najczęściej występujących chorób mózgu, chorzy na nią doznają istotnego pogorszenia jakości życia i nierzadko też społecznego wykluczenia. A zatem, temat podjęty przez Panią mgr Karolinę Nizińską-Smolińską zawiera się w bardzo ważnym i aktualnym obszarze badawczym, którego celem jest poznawanie molekularnych mechanizmów padaczki i ostatecznie - projektowanie nowych, bardziej skutecznych terapii farmakologicznych, zwłaszcza takich, które umożliwią leczenie lekoopornej postaci tej choroby.

W 20-sto stronicowym **Wstępie**, Doktorantka wprowadza czytelnika w zagadnienie epilepsji, jej typów i znanych dotychczas patomechanizmów komórkowych i molekularnych tej choroby. Następnie opisuje najważniejsze modele eksperymentalne stosowane w badaniach nad padaczką. Dużo uwagi poświęca Autorka szczegółowej analizie epigenetycznych mechanizmów regulacji ekspresji genów w padaczce oraz roli kompleksu NuRD i jego składowej, białka Mbd3, w tym procesie.

Ta ciekawie napisana część pracy, odwołująca się do aktualnych pozycji piśmiennictwa, doskonale wprowadza czytelnika w trudne i wciąż mało poznane aspekty patomechanizmów epilepsji, dobrze uzasadniając podjętą tematykę rozprawy.

Mam tu jedynie kilka drobnych uwag:

- str. 23 – w mojej opinii, udział astrocytów w epileptogenezie jest szerszy niż opisano. Astrocyty pełnią w mózgu szereg istotnych funkcji, do których należą: zapewnienie homeostazy energetycznej, wydzielanie gliotransmitterów (w tym glutaminianu), regulacja przepływu krwi i stężenia jonów (szczególnie K^+), jak również regulacja funkcjonowania bariery krew-mózg (BBB). Według danych literaturowych, dysfunkcja astrocytów w którymkolwiek z wymienionych zakresów, pociąga za sobą utratę ich protekcyjnej roli wobec neuronów i może mieć znaczenie w indukcji zmian padaczkowych (Verhoog i wsp., 2020).
- str. 24. - Autorka pisze, że w modelu padaczki wywołanej kwasem kainowym, albumina przedostająca się przez uszkodzoną BBB jest obecna w neuronach, gdzie może indukować aktywność padaczkową. Według mnie, dla dopełnienia całości obrazu, należałoby tu wspomnieć, że ta sama albumina jest obecna w astrocytach, gdzie ma znaczący wpływ na regulację sygnalizacji wapniowej, na zmiany ekspresji genów oraz funkcji tych komórek (Weissberg i wsp., 2011; Weissberg i wsp., 2015; Ivens i wsp., 2007- którego zresztą cytuje Doktorantka).
- str. 28 – na Ryc. 3.2.2.1. w legendzie pod schematem napisano o przedostawaniu się cząsteczek chloru do cytoplazmy neuronu. Oczywiście chodzi o jony chloru Cl^- .
- brakuje informacji przy niektórych rycinach we Wstępie, czy są one efektem pracy koncepcyjnej Doktorantki czy też mają swoje odnośniki w literaturze?

Na tle literatury przedmiotu, własnej pracy badawczej oraz dotychczasowych dokonań macierzystego Zespołu, w rozdziale **Cele i założenia**, Doktorantka stawia hipotezę badawczą, że białko Mbd3, poprzez zmiany w regulacji ekspresji genów, uczestniczy w procesach prowadzących do zmniejszenia progu drgawkowego. Następnie formułuje 6 celów szczegółowych precyzujących zakres planowanych badań, które obejmują zarówno badania in vitro, jak i badania z użyciem 2 zwierzęcych modeli padaczki. Zaplanowano tutaj m.in. zbadanie: wpływu drgawki na ekspresję genu i białka Mbd3, jak też wpływu poziomu ekspresji Mbd3 (zmniejszonego/zwiększonego) na próg drgawkowy w modelu drgawki oraz na epileptogenezę w modelu rozniecania przy użyciu pentylenotetrazolu (PTZ).

Biorąc pod uwagę następstwo czasowe kolejnych etapów pracy koncepcyjnej, sugerowałabym zmianę kolejności wyrazów w tytule tego rozdziału, (a więc, Założenia i cele pracy).

Postawione w dysertacji cele szczegółowe realizowano w starannie przemyślanym zestawie eksperymentów, przy pomocy szerokiej gamy narzędzi badawczych i nowoczesnych technik, w tym m.in. sekwencjonowania nowej generacji.

Materiałem biologicznym wykorzystanym w eksperymentach były zarówno zwierzęta, jak i pierwotne hodowle neuronów korowych transfekowane wektorami wirusowymi modyfikującymi ekspresję białka Mbd3.

W rozdziale **Materiały i metody** wyczerpująco opisano zastosowane zwierzęce modele padaczki (t.j. model drgawki ostrej i model rozniecania PTZ) oraz model wyładowań epileptopodobnych in vitro. Dokładnie scharakteryzowano również wirusy użyte do transfekcji oraz sposób ich podania w eksperymentach in vitro i in vivo. Opisano też metody analizy bioinformatycznej i funkcjonalnej bogatych danych transkryptomicznych otrzymanych z eksperymentów in vitro. Uznane budzi szeroki warsztat metodologiczny, w którym znalazły się m.in. metody biochemiczne, immunochemiczne, mikroskopowe, analizy molekularne i testy behawioralne.

Drobne niedociągnięcia w tym rozdziale dotyczą:

- braku całkowitej liczby zwierząt użytych w eksperymentach in vivo i in vitro
- braku referencji do modelu dawki ostrej i modelu rozniecania PTZ (str. 53, 54)
- braku referencji do punktacji reakcji szczura na bodziec stresowy (Tabela 3; str. 52). Czy jest to ogólnie przyjęta punktacja?
- W teście MTT (str. 64) mierzono wartość absorbancji powstałego barwnika a nie „reakcję kolorymetryczną” jak pisze Doktorantka
- str. 65 – na szkiełka wysiewano i wykonywano zdjęcia **komórek** a nie hodowli, jak napisano.

Otrzymane przez Doktorantkę wyniki stanowią logiczne kontinuum wcześniejszych badań nad rolą białka Mbd3 w epilepsji i procesie epileptogenezy, prowadzonych w Jej macierzystej Pracowni. Pozyskała Ona szereg nowych, oryginalnych danych obrazujących znaczenie białka Mbd3 w tych procesach. Po raz pierwszy wykazała m.in., że drgawki wywołują przejściową nadekspresję Mbd3 na poziomie białka, która jest specyficznie obserwowana w korze śródwęchowej i ciele migdałowatym. Zaobserwowała również, że obniżenie poziomu

tego białka w mózgu zwierząt wykazuje działanie przeciwdrgawkowe, wydłużając czas latencji do wystąpienia drgawki toniczno-klonicznej, podczas gdy nadekspresja Mbd3 działa proepileptogennie. Ponadto wykazała, że zmiany w ekspresji Mbd3 skutkują zmianami behawioralnymi zwierząt w postaci zaburzeń reakcji lękowych.

Szczególnie cenne w odniesieniu do aktualnych światowych trendów badawczych, są według mnie wyniki eksperymentów przeprowadzonych na modelu *in vitro*, gdzie dokonano oceny zmian w ekspresji genów przy zmiennym poziomie Mbd3 zarówno w warunkach fizjologicznych, jak i w warunkach wyładowań epileptopodobnych. Po raz pierwszy dokonano tak drobiazgowej analizy danych transkryptomicznych w tych warunkach i wykazano potencjalne znaczenie wielu nowych grup genów, które nie były dotąd badane w kontekście patologii padaczki. Dane te mogą profilować nowe kierunki badań nad molekularnymi mechanizmami epilepsji i rolą Mbd3 w tej patologii.

Opis wyników badań Doktorantka wzbogaciła obszernym i dobrze przygotowanym materiałem graficznym a uzyskane wyniki korespondują z zaplanowanymi celami pracy.

W rozdziale tym zauważyłam jedynie drobne niedociągnięcie natury redakcyjnej:

- str. 72 – w legendzie do Ryc. 6.1.3. w zdaniu „Poziom białka Mbd3 w korze węchowej...” brakuje frazy „i ciele migdałowatym”.

Ponieważ analiza interesujących wyników zawsze rodzi pytania i pobudza do dyskusji, prosiłabym Doktorantkę o wyjaśnienie czym kierowała się przy wyborze zwierzęcych modeli padaczki do swoich badań? Czy Jej zdaniem wybór modelu może determinować wyniki badań ekspresji i funkcji białka Mbd3, a więc wpływać na wnioski o jego roli w epilepsji i epileptogenezie? (biorąc pod uwagę fakt, że obserwowano specyficzne dla modeli zmiany metylacji DNA, jak pisze Autorka we Wstępie na str. 37).

W rozdziale Dyskusja, Doktorantka udowadnia oryginalność i nowatorstwo swoich wyników, umiejętnie analizując je w kontekście aktualnych danych literaturowych. Jest to według mnie bardzo dobrze napisana część dysertacji, świadcząca o umiejętności głębokiej analizy naukowej. Badania Doktorantki szczególnie w części dotyczącej analizy transkryptomicznej zaowocowały przecież ogromną liczbą danych, często niełatwych do interpretacji.

Jedynie fragment dyskusji dotyczący zmian morfologicznych obserwowanych w neuronach mózgów zwierząt transfekowanych wirusem kontrolnym oraz wirusem z obniżonym poziomem Mbd3 pozostawił we mnie lekki niedosyt.

Zgrubienia wypustek neuronów przypominające tzw. „żylakowatości” występujące u osób po urazie mózgu czy u chorych na chorobę Alzheimera, Doktorantka interpretuje jako efekt stresu wywołanego nadmierną produkcją wirusa w komórce. Czym tłumaczy się występowanie takich zgrubień w przywołanych przez Doktorantkę patologiach mózgu?

Czy zdaniem Doktorantki możliwe jest aby niedobór białka Mbd3 miał jakikolwiek wpływ na powstawanie tego rodzaju zmian? Pytanie takie rodzi się szczególnie w świetle danych wskazujących na zaburzenia w rozgałęzieniu dendrytów u myszy pozbawionych genu dla białka MeCP2, które podobnie jak Mbd3, należy do rodziny białek MBD. Związek pomiędzy obydwojema białkami, choć jedynie w warunkach nadekspresji Mbd3, Doktorantka wykazała w swoich badaniach (zmiany genów regulowanych przez białko MeCP2 w skupieniu 8 w Tabeli 13).

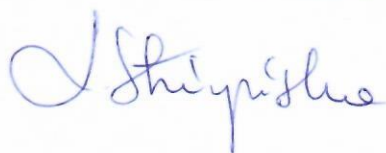
Doktorantka podsumowuje swoje obserwacje w pięciu krótkich punktach. W mojej opinii, zdania zawarte w Podsumowaniu są zbyt lakoniczne, a pkt 5 zawiera tożsamą treść co wniosek nr 3. Rozdział ten zyskałby na znaczeniu poprzez rozszerzenie i uszczegółowienie jego treści. W końcowym rozdziale dysertacji, Doktorantka formułuje cztery prawidłowe wnioski, odpowiadające na postawione cele, z których wynika m.in., że białko Mbd3 wykazuje działanie proepileptyczne, regulując ekspresję wielu genów zaangażowanych w mechanizmy epileptogenne, w sposób specyficzny dla czasu i stanu neuronów.

Podsumowując, otrzymane przez Doktorantkę nowe i oryginalne wyniki wskazują na znaczący udział białka Mbd3 w patologii padaczki, istotnie wzbogacając dotychczasowy stan wiedzy w tym obszarze. Pragnę zaznaczyć, że moje uwagi w najmniejszym stopniu nie obniżają wysokiego poziomu tej dysertacji. Zarówno dobrze przemyślana koncepcja pracy, szeroki zakres zaprojektowanych przez Doktorantkę eksperymentów, jak też sposób przedstawienia wyników i ich dyskusja, świadczą o dojrzałości naukowej jej Autorki i w pełni uzasadniają bardzo wysoką ocenę.

Stwierdzam, że przedłożona mi do oceny rozprawa całkowicie spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dn. 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478, 619, 1630) i wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego PAN w Warszawie o dopuszczenie Pani mgr Karoliny Nizińskiej-Smolińskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego, wnosząc jednocześnie o wyróżnienie rozprawy.

W uzasadnieniu wniosku o wyróżnienie, chcę podkreślić nie tylko wysoką wartość poznawczą badań nad udziałem białka Mbd3 w patomechanizmach epilepsji i epileptogenezy, ale również ich potencjalną wartość translacyjną. Badania Doktorantki wnoszą nową, szeroką wiedzę, która stanowi mocną podstawę do dalszych badań nad Mbd3 jako komórkowym punktem uchwytu dla nowych terapii. W ten sposób, wpisują się one nie tylko w bardzo aktualne trendy badawcze, ale również w potrzeby zdrowotne społeczeństwa w zakresie leczenia epilepsji.

Prof. dr hab. Lidia Strużyńska





Warszawa, 2023-02-16

RECENZJA

rozprawy doktorskiej Karoliny Nizińskiej - Smolińskiej pod tytułem: „Rola białka Mbd3 (methyl-binding protein 3) w procesie epileptogenezy”

Rozprawa doktorska Karoliny Nizińskiej - Smolińskiej została wykonana w Pracowni Epileptogenezy, Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN w Warszawie. Promotorem tej rozprawy jest Prof. Dr hab. Katarzyna Łukasiuk. Badania były finansowane przez Narodowe Centrum Nauki, grant nr 2015/19/B/NZ4/01401.

Padaczka i napady drgawkowe są jednymi z najczęstszych zaburzeń neurologicznych. Postęp w leczeniu tej choroby związany z wdrożeniem wielu nowych leków przeciwdrgawkowych, leczenia dietetycznego (stosowanie diety ketogennej) jak również metod zabiegowych jest niewątpliwy i pozwolił na uwolnienie od napadów wielu pacjentów. Niemniej u pewnego odsetka pacjentów nie udaje się osiągnąć pełnej kontroli napadów. Wydaje się, że przyczyną tego stanu rzeczy jest nie w pełni poznana etiologia drgawek i napadów padaczkowych. Przedstawiona do recenzji rozprawa podejmuje zagadnienie znaczenia zmian w ekspresji białka MBD3 w patogenezie napadów drgawkowych oraz w epileptogenezie z wykorzystaniem przedklinicznego modelu drgawek rozniecanych jak również drgawek ostrych wywołanych podawaniem pentylenetetrazolu (PTZ).

Praca doktorska liczy 168 stron i ma klasyczny układ. Składa się z następujących części: streszczeń (w języku polskim i angielskim), wstępu, celu pracy, opisu użytych materiałów i zastosowanych metod, wyników, dyskusji, podsumowania, wniosków, piśmiennictwa oraz spisu rycin i tabel. Procedury eksperymentalne uzyskały akceptację Lokalnej Komisji Etycznej - uchwała numer: 357/2017, 395/2017 oraz 838/2019.

Wstęp został podzielony na 3 główne podrozdziały, w których Doktorantka wykazując dużą wiedzę omówiła mechanizmy powstawania napadów padaczkowych, eksperymentalne modele drgawek i padaczki z uwzględnieniem zmian neuroplastycznych oraz modyfikacje

1 | Strona

epigenetyczne w regulacji ekspresji genów związane z padaczką. Wstęp jest napisany wyczerpująco i stanowi dobre uzasadnienie do podjętego tematu badań. Nawiązuje też do najnowszego piśmiennictwa związanego z tematem.

Doktorantka nie ustrzegła się w tej części rozprawy pewnych usterek np. BLA (basolateral amygdaloid nucleus) to jądro podstawno-boczne ciała migdałowatego a nie podstawno-boczne ciało migdałowate, jądro podstawno-boczne posterior, to część „tylna” a nie „tylnia” jądra podstawno-bocznego, podobnie w przypadku opisu jąder środkowych, dUTP to według opisu tylko fosfataza, NaCL to nie jest sól fizjologiczna tylko chlorek sodu, jak rozumiem Doktorantka miała na myśli roztwór fizjologiczny soli kuchennej (lub chlorku sodu) czyli 0,9% roztwór NaCl.), drgawki zgeneralizowane to nic innego jak drgawki uogólnione. Warto także wspomnieć o fakcie, że padaczka to nie tylko napady drgawkowe, dlatego definicja podana we wstępie nie jest precyzyjna, podobnie kryteria rozpoznania padaczki. Stosowanie liczby pojedynczej do epizodu drgawek tzn. „drgawka”, pomimo istnienia takiego pojęcia w słownikach języka polskiego jest niezręczne. W zasadzie większość dostępnego polskiego piśmiennictwa posługuje się pojęciem „drgawki”. W samym wstępie akapit dotyczący mechanizmów pojawiania się drgawek pojawia się dwukrotnie w niemal identycznym brzmieniu. W proponowanym przez Doktorantkę podziale stosowanych modeli drgawek, należy zwrócić uwagę, że tzw. modele przewlekłe ze spontanicznymi drgawkami są to modele drgawek występujące w następstwie stanu padaczkowego wywołanego podaniem pilokarpiny lub kwasu kainowego co warto uwzględnić w opisie, zabrakło także bardziej szczegółowego opisu tych modeli. Jako jedną z częstych przyczyn padaczki skroniowej Doktorantka wymienia uszkodzenia ciała migdałowatego (jednostronne lub obustronne). Uszkodzenie obustronne ciał migdałowatych jest raczej rzadkim i nietypowym zjawiskiem w padaczce skroniowej w klinice, znacznie częściej obserwuje się uszkodzenie struktur hipokampa co warto podkreślić w odpowiednim fragmencie wstępu. W tekście znajdujemy także zniekształcenia typu „konserwowana C-końcowa domena” wynikające zapewne z autokorekty tekstu ale wskazana jest uważne przeanalizowanie tekstu rozprawy pod tym kątem. Fragment wstępu dotyczący omówienia dostępnych danych odnoszących się do roli białka Mbd3 w padaczce jest nieco zbyt skrótowo potraktowany zwłaszcza w kontekście dość szczegółowego opisu kompleksu NuRD czy metylacji DNA. Podsumowując pomimo wspomnianych powyżej, pewnych niewielkich niedoskonałości, wstęp jest napisany wyczerpująco, odwołuje się do najnowszych pozycji piśmiennictwa a także wskazuje na luki w obecnym stanie wiedzy tym samym uzasadniając wybór tematu rozprawy.

Celem badań było zbadanie znaczenia białka Mbd3 w kontekście reakcji na napady drgawkowe a także wpływu obniżenia i podwyższenia poziomu białka Mbd3 na próg drgawkowy oraz epileptogenezę. Oceniano także wpływ Mbd3 na ekspresję genów w warunkach *in vitro*.

Metodyka badań jest adekwatna do przyjętych celów, co ma znaczenie dla realizacji celu pracy jak i uzyskania wiarygodnych wyników. Wybór metod badawczych, jak również sposób przeprowadzonych doświadczeń nie budzi zastrzeżeń. Rozprawa zwraca uwagę bardzo bogatą, nowoczesną i zróżnicowaną metodyką, co zasługuje na szczególne wyróżnienie a ponadto stanowi bardzo dobry prognostyk dla dalszej kariery naukowej

Doktorantki. Niemniej wydaje się, że w sekcji materiały warto byłoby podać liczbę zwierząt wykorzystaną w badaniach (choć później grupy są właściwie opisane). Ponadto, moim zdaniem kolejność testów behawioralnych może budzić pewną wątpliwość, ponieważ test reakcji na bodziec stresowy jest jednak bardziej stresujący niż test otwartego pola. PTZ w 0,9%NaCl się rozpuszcza a nie zawiesza jak twierdzi Doktorantka. W skali Racine'a warto uwzględniać wspięcia, pojawiające się na bardziej zaawansowanym etapie drgawek. Badanie poziomu RNA przeprowadzano w lewej półkuli. Czy zmiany w poziomie RNA są identyczne dla obu półkul, czy istnieje ryzyko, że pomiary te w prawej półkuli dałyby inne wyniki?

Wyniki badań zostały podzielone na 7 podstawowych podrozdziałów opisujących: wpływ drgawek na ekspresję genu Mbd3 oraz poziom białka Mbd3 in vivo, działanie wirusów zastosowanych w celu obniżenia ekspresji i nadekspresji Mbd3 in vitro i in vivo, wpływ obniżenia ekspresji genu Mbd3 oraz zmniejszenia poziomu białka Mbd3 na zachowanie zwierząt i próg drgawkowy in vivo, wpływ nadekspresji genu Mbd3 oraz zwiększenia poziomu białka Mbd3 na zachowanie zwierząt i próg drgawkowy, wpływ obniżenia ekspresji Mbd3 na epileptogenezę w modelu rozniecania przy użyciu PTZ, wpływ nadekspresji Mbd3 oraz wzrostu poziomu białka Mbd3 na epileptogenezę w modelu rozniecania przy użyciu PTZ, wreszcie wpływu nadekspresji Mbd3 na ekspresję genów w modelu wyładowań epileptopodobnych in vitro.

Sekcja wyniki nie budzi istotnych zastrzeżeń, zwraca uwagę staranna szata graficzna prezentowanych wyników. Niemniej nasunęły mi się pewne wątpliwości.

W wyniku podania PTZ w dawce 55 mg/kg, które wywołał ostry napad drgawek nie stwierdzono zmian w poziomie mRNA w badanych rejonach mózgu. Zaobserwowano wzrost poziomu białka Mbd3 w korze śródmózgowej i amygdala po 4 h od napadu drgawek, bez istotnych zmian po 8, 24 i 48 godzin. Czym można tłumaczyć brak zależności pomiędzy poziomem mRNA i białkiem?

Ponadto, u zwierząt z wyindukowanym deficytem białka Mbd3 w testach behawioralnych stwierdzono, brak różnic z grupą kontrolną w zakresie testów elevated plus maze i w reakcji na bodziec stresowy. W teście otwartego pola zaobserwowano skrócenie czasu przebywania w centrum pola co sugerować by mogło pewien efekt prołękowy. Niemniej brak różnic w teście EPM wskazuje, że efekt ten jest niewielki. W teście otwartego pola zabrakło mi przedstawienia poza czasem przebywania w sektorach otwartego pola określenia dystansu w poszczególnych sektorach, natomiast oba wykresy pokazujące czas w zewnętrznym i wewnętrznym sektorze są bardzo zależne od siebie (np. spadek czasu w zewnętrznym sektorze automatycznie da zwiększenie czasu w wewnętrznym sektorze).

Obniżenie poziomu białka Mbd3 spowodowało natomiast nieistotne zmniejszenie odsetka zwierząt z drgawkami 4-5 stopnia (toniczno-klonicznymi) u 3 zwierząt na 10 oraz widoczne wydłużenie czasu do wystąpienia drgawek toniczno-klonicznych. Ten element danych jest nieco dla mnie niejasny. Na rycinie 6.3.2.1.C widzimy, że 3 zwierzęta nie osiągnęły napadów toniczno-klonicznych natomiast na rycinie 6.3.2.1.B prezentującej latencję do drgawek toniczno-klonicznych jest uwzględnione 10 zwierząt (czyli wszystkie). Wydaje się, że wspomniane 3 zwierząt z ryciny C, które nie osiągnęły drgawek 4/5 stopnia nie powinny być uwzględniane w ocenie latencji do drgawek toniczno-klonicznych.

Analiza behawioralna wpływu nadekspresji Mbd3 wykazała niewielki efekt przeciwlękowy (wydłużenie przebywania w wewnętrznej strefie areny). Pozostałe testy behawioralne podobnie jak u zwierząt z deficytem MBd3 nie wykazały różnic. Nie wykazano także wpływu na drgawki ostre wywołane przez PTZ.

Testy behawioralne służące ocenie wpływu obniżenia ekspresji Mbd3 i poziomu białka Mbd3 na zachowanie były przeprowadzone dwukrotnie. Raz poprzedzały podania PTZ na ostro, drugi raz procedurę rozniecania. O ile wyniki doświadczeń behawioralnych są spójne, to jaki był powód powtarzania tych samych doświadczeń w tych dwóch układach eksperymentalnych? Czy powodem było przetestowanie wpływu implantacji elektrod na zachowanie?

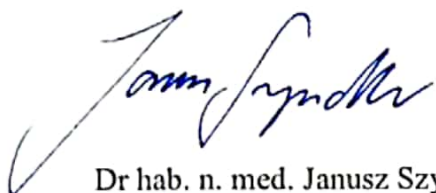
Przeprowadzono także analizę wpływu obniżenia poziomu Mbd3 na szybkość rozniecania drgawek. Nie zaobserwowano istotnych różnic w porównaniu do grupy kontrolnej. Z kolei podwyższenie poziomu białka Mbd3 skutkowało istotnymi zmianami w procesie rozniecania (większa intensywność drgawek po 4 i 5 podaniu leku) jednakże, efekt ten był przejściowy i począwszy od 5 stymulacji do 9 stymulacji nie zaobserwowano istotnych różnic między grupami. Niejasne jest dla mnie liczba iniekcji PTZ w procedurze rozniecania oraz maksymalna liczba iniekcji. Wykres przedstawiający przebieg rozniecania obejmuje 10 sesji jednakże z innych rycin wynika że sesji było więcej np. liczba sesji do osiągnięcia napadów 4/5 stopnia wynosiła w niektórych przypadkach ponad 30. Konieczne jest przedstawienie odpowiednich zestawień, podobnie jak aktualizacja wykresów przebiegu rozniecania bez ograniczenia do 10 sesji.

Rozprawę kończy dyskusja, w której Doktorantka konfrontuje uzyskane wyniki z danymi pochodzącymi z aktualnego piśmiennictwa. O ile dane z piśmiennictwa są zaprezentowane wyczerpująco to pewien niedosyt pozostawia interpretacja własnych wyników. Więcej miejsca moim zdaniem należałoby poświęcić na analizę potencjalnych przyczyn leżących u podstaw obserwowanych zmian. W chwili obecnej Doktorantka skoncentrowała się raczej na omawianiu mechanizmów zidentyfikowanych w analizie bioinformatycznej, które wiążą się z działaniem białka Mbd3. Nie jest jasne, który mechanizm albo mechanizmy Doktorantka uważa za najbardziej prawdopodobny z punktu widzenia skutków obniżenia lub podwyższenia białka Mbd3.

Na podstawie uzyskanych danych Doktorantka sformułowała cztery wnioski. Wnioski zaprezentowane przez Doktorantkę są daleko idące. Szczególnie wpływ nadekspresji na szybkość rozniecania był przejściowy (dotyczył tylko dwóch punktów czasowych) a wpływ na inne parametry był umiarkowany. Moim zdaniem jednoznaczne określenie roli białka Mbd3 w epileptogenezie zdecydowanie wymaga dalszych badań.

Podsumowując, należy stwierdzić, że pewne niedoskonałości zidentyfikowane w pracy nie umniejszają jej wartości. Na szczególne uznanie zasługuje warsztat naukowy i zastosowana metodologia badań. Poszczególne etapy badań logicznie następowały po sobie i obejmując zarówno badania behawioralne, molekularne i bioinformatyczne.

Rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478, 619, 1630)" i wnioskuję zatem o dopuszczenie doktorantki mgr Karoliny Nizińskiej-Smolińskiej do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora.



Dr hab. n. med. Janusz Szyndler

Katedra i Zakład Farmakologii Doświadczalnej i Klinicznej
Warszawski Uniwersytet Medyczny
ul. Banacha 1B, 02-091 Warszawa



**Instytut Farmakologii
im. Jerzego Maja
Polskiej Akademii Nauk**

prof. dr hab. Małgorzata Kajta
Pracownia Neurofarmakologii i Epigenetyki
Zakład Farmakologii
ul. Smętna 12, 31-343 Kraków
e-mail: kajta@if-pan.krakow.pl

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Mgr Karoliny Nizińskiej-Smolińskiej

pt. „Rola białka Mbd3 w procesie epileptogenezy”

OGÓLNA CHARAKTERYSTYKA ROZPRAWY

Rozprawa doktorska mgr Karoliny Nizińskiej-Smolińskiej powstała pod kierunkiem prof. dr hab. Katarzyny Łukasiuk w Pracowni Epileptogenezy Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego Polskiej Akademii Nauk w Warszawie. Fundusze na badania pochodziły z kierowanego przez Panią Promotor, a finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki, grantu OPUS (2015/19/B/NZ4/01401) pt. „Rola MBD3 (methyl-binding protein 3) w epileptogenezie”.

Rozprawę stanowi 168-stronicowe opracowanie z wyodrębnionymi rozdziałami, takimi jak: *Wykaz Skrótów, Streszczenie, Summary* (tj. streszczenie w j. angielskim), *Wstęp, Cele i Założenia Pracy, Materiały i Metody, Wyniki, Dyskusja*, a także *Podsumowanie, Wnioski i Bibliografia*. Spis piśmiennictwa zacytowanego w rozprawie zawiera ponad 210 publikacji, głównie anglojęzycznych i z ostatnich lat, co dowodzi zaznajomienia się przez Doktorantkę z najnowszą literaturą fachową. Struktura pracy odpowiada obowiązującym standardom, a *Streszczenie* przedstawia najważniejsze wyniki badań w przejrzysty sposób.

Tematyka podjęta w rozprawie doktorskiej obejmuje problematykę epileptogenezy w kontekście dosyć mało jeszcze poznanego białka zaangażowanego w metylację DNA, jakim jest MBD3 (ang. *methyl-CpG-binding domain protein 3*). Najnowsze badania wskazują na znaczenie tego białka w powstawaniu drgawek przy udziale metylotransferazy DNMT1 i hipermetylacji genu kodującego TREM2 (ang. *triggering receptor expressed on myeloid cells*

2) w miejscu cg25748868, a także dzięki zahamowaniu szlaku kinaz PI3K/Akt (Wang i wsp. 2021, *Neurochem Res*). Narażenie myszy na czynnik neurotoksyczny w postaci chlorku glinu i wywołane tym upośledzenie procesów poznawczych i pamięci próbuje się tłumaczyć zmianami w poziomie białek MBD (Ikram i wsp. 2021, *Biol Trace Elem Res*). Dowiedziono, że kompleks zawierający białko MBD3 wpływa na proliferację komórek progenitorowych neuronów i ich różnicowanie; obniżony poziom MBD3 sprzyja neurogenezie, a jego nadreprezentacja hamuje różnicowanie komórek w neurony (Moon i wsp. 2017, *PLoS Biol*). Publikacja zespołu Pani Prof. Katarzyny Łukasiuk z 2016 r. (Bednarczyk i wsp. *Sci Rep*) opisuje po raz pierwszy zmiany w poziomie białka MBD3 obserwowane w zwierzęcym (szczur) modelu padaczki skroniowej.

Z uwagi na nieliczne doniesienia nt. roli pełnionej przez białko MBD3 w układzie nerwowym, w tym również w procesie epileptogenezy, uważam temat przedłożonej rozprawy doktorskiej za wysoce oryginalny. Zważywszy że badania Autorki rozprawy obejmują modelowanie choroby, wartość translacyjna przedstawionych badań jest bezsporna.

MERYTORYCZNA ANALIZA ROZPRAWY

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska jest próbą identyfikacji mechanizmów, za pośrednictwem których:

- i. podczas drgawek zmienia się poziom białka MBD3 i kodującego je genu, a białko MBD3:
- ii. zmienia próg drgawkowy w szczurzym modelu drgawek wywołanych pentylenetetrazolem (PTZ) tj. w modelu ostrego napadu drgawkowego,
- iii. oddziałuje na epileptogenezę w modelu rozniecania przez PTZ,
- iv. reguluje geny w modelu wyładowań epileptopodobnych *in vitro*.

Postawiona przez Doktorantkę hipoteza badawcza zakłada, że poprzez regulację ekspresji genów białko MBD3 zmniejsza próg drgawkowy. W tym miejscu zabrakło jednak sugestii o jakie geny może chodzić.

W celu zweryfikowania powyższej hipotezy Doktorantka zastosowała zwierzęcy model drgawki ostrej indukowanej przez PTZ, zwierzęcy model rozniecania drgawek przy użyciu PTZ oraz komórkowy (neurony kory mózgowej) model wyładowań epileptopodobnych. Wykorzystała również szereg procedur służących obniżeniu lub zwiększeniu ekspresji *Mbd3* w badaniach *in vivo* i *in vitro* (m.in. domózgowa iniekcja wirusów z sekwencją szczurzego genu *Mbd3*, transfekcja komórek w hodowli). Zastosowane układy badawcze, analizy i pomiary

posiadają właściwe kontrole i układy odniesienia, co dowodzi rzetelnego przygotowania Doktorantki do prowadzenia badań. Imponujący jest zwłaszcza wachlarz metod - od modelowania drgawek, ich rejestracji i testów behawioralnych, poprzez pomiary poziomu mRNA i białek oraz barwienia immunofluorescencyjne, aż po najbardziej wyrafinowane sekwencjonowanie nowej generacji (NGS) wsparte analizami danych transkryptomicznych.

Wprawdzie rozdział *Materiały i Metody* zawiera zazwyczaj szczegółowy opis przeprowadzonych doświadczeń, rozdział 5.2.11.3 – *Transfekcja komórek neuronalnych* jest wyjątkowo lapidarny. Brakuje w nim m.in. podstawowej informacji o stężeniu materiału transfekcyjnego w celu zwiększenia ekspresji genu *Mbd3* w szczurzych neuronach mózgu w hodowli *in vitro*. Wątpliwości budzi trafność tytułu rozdziału 5.2.7.3, w którym określenie „Elektroforeza białek - metoda Western Blot” sugeruje, że ww. metoda sprowadza się do elektroforetycznego rozdzielania białek. Ten tytuł jest tym bardziej niefortunny, ponieważ rozdział zawiera odrębne podrozdziały przedstawiające istotę metody, w tym 5.2.7.3.3 – *Rozdział elektroforetyczny na żelu poliakrylamidowym* oraz 5.2.7.3.4 – *Transfer białek na membranę nitrocelulozową*. Pragnę również podkreślić, że w myśl obowiązującej nomenklatury nazwa białka MBD3 powinna być pisana wyłącznie z dużych liter. W przypadku genów obowiązuje kursywa, przy czym gen występujący u człowieka należy pisać dużymi literami, a pisownia genu występującego u pozostałych ssaków wymaga tylko dużej pierwszej litery. Niestety, w rozprawie pisownia białka MBD3 i genu *Mbd3* nie zawsze jest poprawna.

Zmiany w poziomie metylacji DNA uważane są od niedawna za prognostyk zaburzeń i chorób układu nerwowego, z chorobą Alzheimera, udarem niedokrwinnym i padaczką włącznie. Ostatnio, w oparciu o ogólnie dostępne biblioteki metylacji DNA udało się stworzyć wzorec/sygnaturę metylacji genu *KMT2D* związanego z zespołem Kabuki (Hildonen i wsp. 2023, *Clin Genet*), co potwierdza diagnostyczną wartość tego parametru. Metylacja DNA jest podstawowym mechanizmem epigenetycznym, który wspólnie z potranslacyjnymi modyfikacjami histonów i niekodującymi cząsteczkami RNA reguluje ekspresję genów i w ten sposób wpływa na różnicowanie komórek i rozwój. Metylacja promotora genu wiąże się najczęściej z zahamowaniem/represją transkrypcji. Mimo iż hipermetylacja genu prowadzi zazwyczaj do jego wyciszenia, a hipometylacja aktywuje transkrypcję, od tej zasady są wyjątki. Okazało się bowiem, że promotor genu z nielicznymi wyspami CpG jest podatny na metylację, natomiast promotor genu zawierający wiele wysp CpG metylacji unika (Chatterjee and Vinson, 2012, *Biochim Biophys Acta*). Jest to jeden z powodów, dla których pomiar poziomu metylacji poszczególnych genów próbuje się uzupełnić pomiarem globalnej metylacji DNA oraz

określeniem ekspresji i funkcji czynników, które regulują metylację DNA, w tym białka MBD3 stanowiącego obiekt badań Autorki rozprawy.

Obecnie farmakoterapia padaczki polega głównie na leczeniu objawowym, czego skutkiem jest wysoki odsetek pacjentów bez kontroli napadów. Co więcej, wielu chorych wykazuje lekooporność. Rosnąca liczba przypadków choroby jest tłumaczona coraz częstszym występowaniem wariantów genów związanych z funkcjami epigenetycznymi, wśród których wymienia się geny kodujące metylotransferazy DNA, *DNMT1* i *DNMT3A*. Dotychczas udało się wykazać, że u ludzi cierpiących na padaczkę skroniową występuje podwyższona ekspresja genu *DNMT* (Zhu Q, i wsp. 2012, *J Mol Neurosci*), a obniżenie poziomu białek DNMT hamuje metylację DNA i epileptogenezę w modelach zwierzęcych (Miller-Delaney i wsp. 2012, *J Neurosci*). Z najnowszych badań wynika, że u chorych na lekooporną padaczkę skroniową występują zmiany w poziomie metylacji genów (m.in. *SHANK3*, *SBF1*, and *MCF2L*), przy czym dotyczą one przede wszystkim kory mózgowej, a w mniejszym stopniu obszarów hipokampa i ciała migdałowatego (Sánchez-Jiménez i wsp. 2023, *Mol Neurobiol*). Z tego względu postuluje się, że sukces terapeutyczny mogą przynieść leki oddziałujące w sposób selektywny na metylację DNA specyficznych genów, których identyfikacja stanowiła jeden z celów ocenianej rozprawy.

Rozprawa została opatrzona obszernym *Wstępem*, który dzięki informacjom nt. takich zagadnień jak padaczka, eksperymentalne modele drgawek i padaczki oraz modyfikacje epigenetyczne w regulacji ekspresji genów wprowadza czytelnika w tematykę badań. Wprawdzie Autorka rozprawy wspomina o około 20 lekach przeciwpadaczkowych, ale żadnego z nich nie wymienia z nazwy.

Wyniki badań zostały przedstawione w formie wykresów (30) i tabel (13), a także zdjęć z mikroskopu fluorescencyjnego (9) i przykładowych zdjęć rozdziału białek metodą western blot (2). Przebieg doświadczeń został zilustrowany 4 schematami. Opracowanie zawiera także *Materiały dodatkowe* z 6 tabelami z wykazem genów o zmienionej ekspresji wywołanej indukcją wyładowań epileptopodobnych w hodowli neuronów *in vitro*. Wykazy genów dotyczyły neuronów bez transfekcji, neuronów poddanych transfekcji wirusem kontrolnym oraz neuronów z nadekspresją genu *Mbd3*.

W nawiązaniu do hipotezy i celów badawczych, wyniki uzyskane przez Doktorantkę można podsumować w następujący sposób:

1. W wyniku drgawek wywołanych pentylenetetrazolem (PTZ) w korze śródwęchowej i ciele migdałowatym szczura rośnie poziom białka MBD3, co jest efektem

przejściowym (tylko 4 godziny po wystąpieniu drgawki) i specyficznym dla wymienionych struktur mózgu (nie występuje w hipokampie i korze somatosensorycznej).

2. Obniżenie lub podwyższenie ekspresji *Mbd3* poprzez iniekcję odpowiedniego wektora wirusowego do obszaru ciała migdałowatego w mózgu szczura zmienia zachowanie mierzone testem otwartego pola. Zwierzęta z obniżoną ekspresją przebywają dłużej w zewnętrznej strefie areny a krócej w strefie wewnętrznej. Zwierzęta z nadekspresją przebywają krócej w zewnętrznej strefie areny a dłużej w strefie wewnętrznej. W teście reakcji na bodziec stresowy i teście uniesionego labiryntu krzyżowego nie zaobserwowano różnic behawioralnych między zwierzętami ze zmienioną ekspresją *Mbd3* a zwierzętami kontrolnymi.
3. Szczury z obniżoną ekspresją *Mbd3* wykazują wydłużony czas latencji do wystąpienia drgawki toniczno-klonicznej w modelu ostrego napadu drgawkowego wywołanego przez PTZ .
4. Szczury z nadekspresją *Mbd3* charakteryzuje przyspieszona epileptogeneza w modelu rozniecania przez PTZ, co stwierdzono w 4. i 5. sesji rozniecania.
5. Wyładowania epileptopodobne indukowane niedoborem Mg^{2+} w neuronach kory mózgowej w hodowli *in vitro* zmieniają (w większości hamują/obniżają) ekspresję 25 genów związanych z glikozylacją, aktywacją receptora dla kwasu kainowego oraz fosforylacją białek.
6. Transfekcja neuronów w hodowli *in vitro* wirusem kontrolnym, a następnie indukcja wyładowań epileptopodobnych zmienia ekspresję 49 genów związanych z funkcjonowaniem kanałów potasowych.
7. Transfekcja neuronów w hodowli *in vitro* wirusem do nadekspresji *Mdb3*, a następnie indukcja wyładowań epileptopodobnych obniża ekspresję 2 genów tj. *Foxc1* i *Tm6sf1*.
8. Podczas wyładowań epileptopodobnych w komórkach z nadekspresją *Mbd3*, dla których układem odniesienia są komórki transfekowane wirusem kontrolnym, zaobserwowano zmiany w poziomie ekspresji: 40 genów zaangażowanych głównie w szlak sygnałowy NOTCH (2 godz. po indukcji wyładowań), 2 genów zaangażowanych w aktywację kinaz (6 godz. po indukcji wyładowań), a także 17 genów wpływających na metabolizm steroidów i fruktozy oraz na aktywację kinaz (24 godz. po indukcji wyładowań).

9. Analiza funkcjonalna danych transkryptomicznych wykazała, że nadekspresja genu *Mbd3* w neuronach kory mózgowej w hodowli *in vitro* spowodowała zmiany w ekspresji: **i.** genów związanych z NOTCH, IGF-1, biosyntezą i metabolizmem fruktozy, a także metabolizmem hormonów steroidowych, co stwierdzono w warunkach fizjologicznych oraz po indukcji wyładowań epileptopodobnych. **ii.** genów związanych m.in. z kanałami potasowymi i GABA_B, co stwierdzono w warunkach fizjologicznych. **iii.** genów związanych z receptorami FGFR1, FGFR2 i IGF1R, szlakami sygnałowymi kinazy PI3K i reliny, co jest specyficzne dla wyładowań epileptopodobnych.

Wielka szkoda, że zawarte w rozprawie podsumowanie wyników badań jest nad wyraz lakoniczne, co nie służy podkreśleniu wartości dokonanych odkryć i stoi w kontrze do ogromnej liczby testów, pomiarów i analiz wykonanych przez Doktorantkę. Jest to tym bardziej niezrozumiałe, ponieważ *Dyskusja* poprzedzająca *Podsumowanie* została napisana w sposób klarowny i spójny, z uwzględnieniem najnowszych publikacji i wnikliwą analizą własnych oryginalnych wyników. Nie ukrywam, że oczekiwałam przynajmniej schematu, który byłby ilustracją najważniejszych wyników uzyskanych przez Autorkę rozprawy. Wnioski wysnute na podstawie przeprowadzonych doświadczeń, aczkolwiek ostrożne, są adekwatne do celów i założeń pracy.

Oдноśnie zwierząt z wywołaną eksperymentalnie nadekspresją *Mbd3*/MBD3, dlaczego próg drgawkowy u tych zwierząt pozostaje na tym samym poziomie, co u zwierząt kontrolnych? Одноśnie hodowli *in vitro*, co spowodowało, że komórki nerwowe z obniżoną ekspresją *Mbd3* mają również obniżoną żywotność? We *Wstępie* zostały zacytowane publikacje dotyczące profilowania transkryptomu u pacjentów z padaczką skroniową oraz w zwierzęcym modelu padaczki skroniowej wywołanej kwasem kainowym. Proszę spróbować wytłumaczyć z czego mogą wynikać diametralnie różne poziomy metylacji genów u pacjentów i zwierząt.

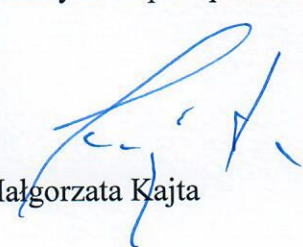
PODSUMOWANIE i WNIOSEK KOŃCOWY

Podjęcie przez Doktorantkę tematyki epileptogenezy w kontekście białka MBD3 stwarza perspektywę pełniejszego poznania etiologii zaburzeń układu nerwowego o podłożu epigenetycznym. Dotyczy to zwłaszcza chorób neurorozwojowych z atypową migracją neuronów, do których, obok padaczek, zalicza się m.in. zespół Tourette'a, schizofrenię i autyzm/spektrum autyzmu. Poznanie mechanizmów, za pośrednictwem których białko MBD3 zmienia profile ekspresji genów podczas epileptogenezy i zależne szlaki sygnałowe może służyć poprawie farmakoterapii chorób OUN. Jak już wspomniałam, rozprawa doktorska Pani

mgr Karoliny Nizińskiej-Smolińskiej jest wysoce oryginalna, a wyniki badań przedstawiają dużą wartość translacyjną, ponieważ zostały uzyskane z wykorzystaniem zaawansowanych modeli chorób OUN oraz nowoczesnych metod i technik badawczych. Doktorantka umiejętnie połączyła wiedzę i kompetencje z zakresu modelowania drgawek *in vivo* i *in vitro*, iniekcji domózgowych i transfekcji komórek nerwowych w hodowli, a także analiz molekularnych, by w kompleksowy sposób zweryfikować postawioną hipotezę badawczą i udowodnić, że białko MBD3 stymuluje epileptogenezę, czemu towarzyszą zmiany w ekspresji genów związanych zwłaszcza ze szlakami sygnałowymi kinazy PI3K, reliny i FGFR.

Rozprawa doktorska **mgr Karoliny Nizińskiej-Smolińskiej pt. „Rola białka Mbd3 w procesie epileptogenezy”** spełnia wymagania określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478, 619, 1630). Wniosuję o dopuszczenie mgr Karoliny Nizińskiej-Smolińskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Kraków, 17 lutego 2023 r.



Małgorzata Kajta