

Prof. dr hab. Wiesława Jarmuszkiewicz
Instytut Biologii Molekularnej i Biotechnologii
Wydział Biologii
Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu

Poznań, 28.03.2025

RECENZJA PRACY DOKTORSKIEJ

Imię i nazwisko kandydatki: mgr Oksana Stępińska

Tytuł rozprawy doktorskiej: Rola N-metylotransferazy nikotynoamidowej w odpowiedzi metabolicznej komórek śródbłónka wywołanej lipopolisacharydem

Promotor: prof. dr hab. Krzysztof Zabłocki

Recenzent: prof. dr hab. Wiesława Jarmuszkiewicz

1. Tematyka rozprawy

Tematyka rozprawy doktorskiej dotyczy zagadnień istotnych dla rozwoju dyscypliny nauki biologicznej. Oceniana rozprawa doktorska koncentruje się na badaniu odpowiedzi metabolicznej ludzkich komórek śródbłónka aorty (HAEC) wywołanej silnym induktorem zapalnym – bakteryjnym lipopolisacharydem (LPS) oraz na wpływie enzymu N-metylotransferazy nikotynoamidowej (NNMT) na tę odpowiedź. Podstawowym celem pracy było zrozumienie molekularnych/biochemicznych mechanizmów zmian, szczególnie w metabolizmie energetycznym/mitochondrialnym komórek śródbłónka, wywołanych przez LPS w warunkach stanu zapalnego bez pogorszenia przeżywalności komórek, w odniesieniu do zmian w ilości/aktywności NNMT. Badania miały na celu sprawdzenie, jak obecność badanej metylotransferazy wpływa na te procesy, a także ocenienie, jak wyciszenie genu kodującego ten enzym może wpłynąć na inne aspekty komórkowe, niezwiązane bezpośrednio z przemianami energetycznymi. W szerszym aspekcie, badania te są ważne dla lepszego zrozumienia mechanizmów zapalnych i ich regulacji, co może mieć znaczenie aplikacyjne w kontekście chorób zapalnych, takich jak sepsa.

2. Wiedza kandydatki

Przedłożona rozprawa doktorska, poświęcona analizie roli NNMT w odpowiedzi metabolicznej komórek śródbłónka hodowanych w obecności LPS, świadczy o solidnym warsztacie badawczym i zrozumieniu zagadnień z dziedziny biologii komórkowej/biochemii jej autorki. Lektura rozprawy wskazuje na dużą wiedzę Kandydatki o roli śródbłónka naczyniowego w odpowiedzi zapalnej i jego mechanizmów ochronnych przed patogenami, w tym bakteryjnym LPS. Praca odnosi się do aktualnych badań naukowych dotyczących funkcji śródbłónka, procesów zapalnych oraz metabolizmu komórkowego, a także omawia rolę metylotransferazy NNMT w tych procesach, co jest stosunkowo mało znane w literaturze. We wprowadzającej części pracy, Autorka przedstawiła szeroki kontekst teoretyczny, umiejętnie porządkując dostępne dane literaturowe i wskazując problemy badawcze, które zamierza rozwiązać. W dalszych częściach rozprawy poddała szczegółowej i krytycznej analizie uzyskane wyniki, które umiejętnie przedyskutowała w oparciu o dostępne dane literaturowe. Świadczy to, że mgr Oksana Stępińska nie tylko kompetentnie posługuje się technikami eksperymentalnymi (takimi jak, detekcja białek metodą Western blot, pomiary fluorymetryczne produkcji reaktywnych form tlenu, potencjału błonowego, pojemnościowego napływu wapnia, oznaczanie metabolitów metodą HPLC-MS, pomiar szybkości zużycia tlenu czy wyciszanie genu) ale również rozumie podstawy teoretyczne potrzebne do ich zastosowania.

Podsumowując, oceniana rozprawa prezentuje dużą wiedzę teoretyczną Kandydatki z zakresu biologii komórkowej i biochemii, co stanowi podstawę do ubiegania się o stopień doktora w dyscyplinie nauk biologicznych.

3. Samodzielność kandydatki

Przedłożona rozprawa doktorska wskazuje, że mgr Oksana Stępińska posiada umiejętność samodzielnego prowadzenia badań naukowych. Obok wcześniej opisanej wiedzy Kandydatki w obszarze biologii śródbłonka naczyń, stanu zapalnego czy roli metylotransferazy NNMT, wskazują na to także jej umiejętność projektowania eksperymentów a także umiejętność krytycznej ich analizy, konfrontacji własnych wyników z literaturą naukową czy wskazania luk w dotychczasowych badaniach. Kandydatka nie tylko kompetentnie używa dostępne narzędzia badawcze, lecz także umie korzystać z nabytej wiedzy, co jest kluczowe dla samodzielnej pracy naukowej.

Podsumowując, oceniana rozprawa doktorska dowodzi, że mgr Oksana Stępińska potrafi samodzielnie prowadzić badania naukowe, poczynwszy od projektowania eksperymentów, przez wykonanie badań, aż po analizę i interpretację wyników.

4. Oryginalność rozprawy

Oryginalność ocenianej pracy doktorskiej polega na nowym podejściu do zrozumienia roli LPS w indukowaniu odpowiedzi zapalnej w komórkach śródbłonka z uwzględnieniem parametrów metabolicznych, szczególnie związanych z mitochondriami i energetyką komórkową, w odniesieniu do obecności metylotransferazy NNMT. Badania opisane w pracy poszerzają dotychczasową wiedzę w zakresie biologii komórek śródbłonka oraz wnoszą nowe spostrzeżenia dotyczące mechanizmów adaptacyjnych, które mogą występować w odpowiedzi na stres zapalny, jak również wskazują na potencjalną rolę enzymu NNMT w tym procesie. Część przedstawionych wyników została już opublikowana w *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* (2022) a Kandydatka jest w tej publikacji pierwszym autorem.

Oryginalność ocenianej rozprawy można ująć w kilku aspektach:

1. Opisanie zmian w sieci mitochondrialnej komórek śródbłonka wywoływanych przez LPS – Przedstawione badania wykazały, że LPS indukuje przejściową fragmentację sieci mitochondrialnej oraz zmianę lokalizacji mitochondriów na okołojądrową, co nie było wcześniej szeroko badane w kontekście odpowiedzi zapalnej wywołanej przez LPS w komórkach śródbłonka. Odwracalność tych zmian po dłuższej inkubacji komórek w obecności LPS sugeruje, że mitochondria poprzez zmianę swojej dynamiki mogą uczestniczyć w mechanizmach adaptacyjnych komórek w odpowiedzi na LPS.
2. Dostarczenie nowych informacji na temat wpływu LPS na metabolizm energetyczny komórek śródbłonka – Kandydatka opisała przejściowe zmiany w metabolizmie energetycznym komórek śródbłonka wywołane przez LPS widoczne jako obniżenie oddychania mitochondrialnego, zmniejszenie zawartości metabolitów glikolizy, cyklu kwasów trikarboksylowych i mleczanu. Wycofywanie się/odwracalność tych zmian po 24 godzinach inkubacji z LPS wskazuje na adaptację metabolizmu energetycznego do długotrwałego stanu zapalnego.
3. Po raz pierwszy opisanie potencjalnej roli metylotransferazy NNMT w odpowiedzi metabolicznej komórek śródbłonka na stres wywołany przez LPS – Jednym z najbardziej oryginalnych aspektów pracy jest zidentyfikowanie i zbadanie roli metylotransferazy NNMT w odpowiedzi komórek śródbłonka na LPS. Odkrycie, że LPS prowadzi do zwiększenia poziomu

NNMT w komórkach śródbłónka oraz fakt, że wyciszenie genu kodującego NNMT wpływa na wiele aspektów odpowiedzi komórek na LPS, w tym stres oksydacyjny, dynamikę mitochondriów, metabolizm energetyczny i regulację poziomu wapnia, ma istotne znaczenie w badaniach nad odpowiedzią zapalną. Co ciekawe, w komórkach śródbłónka z wyciszonym genem *NNMT* i traktowanych LPS obserwowano także zmianę profilu białek związanych z autofagią i adaptacyjnym mechanizmem odpowiedzi na stres UPR oraz ograniczenie tworzenia się organelli o odczynie kwaśnym. Bardzo ważna jest obserwacja, że wyciszenie genu *NNMT* może łagodzić niektóre elementy odpowiedzi komórek śródbłónka na stres wywołany przez LPS lub przyspieszać powrót do stanu sprzed jego indukcji. Przedstawione wyniki wskazują, że metylotransferaza NNMT, jako enzym wpływający na metylację białek i regulację metabolizmu, stanowi istotny element reakcji komórek śródbłónka na LPS, przynajmniej w kontekście metabolizmu energetycznego.

W pracy Kandydatka zaproponowała, że w przyszłości farmakologiczna modulacja aktywności NNMT mogłaby prowadzić do złagodzenia niektórych zmian metabolicznych związanych z odpowiedzią na LPS, w tym do zmniejszania negatywnych skutków związanych ze stanem zapalnym. Badania nad inhibicją NNMT mogłyby w przyszłości prowadzić do opracowania nowych strategii terapeutycznych w leczeniu stanów zapalnych, w tym sepsy, co ma istotne znaczenie aplikacyjne.

Podsumowując, oceniana rozprawa doktorska stanowi oryginalne rozwiązanie problemu badawczego jakim jest opisanie wpływu LPS na komórki śródbłónka, szczególnie w kontekście ich metabolizmu energetycznego, udziału metylotransferazy NNMT w odpowiedzi zapalnej oraz wpływu tych procesów na funkcjonowanie komórek. Badania te mogą mieć znaczenie zarówno w kontekście podstawowych badań nad mechanizmami zapalenia, jak i potencjalnych aplikacji terapeutycznych.

5. Pytania i/lub uwagi krytyczne, na które recenzent oczekuje odpowiedzi w czasie obrony:

1. Metodologia. Brakuje informacji o stężeniu jonów magnezu i wapnia w roztworze PBS zawierającym te jony. Brakuje opisu metody pomiaru przeżywalności komórek z użyciem cytometru przepływowego (wyniki przedstawione na Rys. 4.2).
2. Punkt 3.12, str. 92. Zużycie tlenu w obecności oligomycyny, inaczej przeciek H^+ lub zużycie tlenu nie związane z syntezą ATP to nie „minimalna konsumpcja tlenu” czy „minimalne oddychanie mitochondrialne”. Dlaczego do pomiaru zużycia tlenu przez komórki śródbłónka przy użyciu aparatu Seahorse użyto m.in. glukozę w stężeniu 10 mM czyli prawie dwukrotnie większym niż fizjologiczne i stosowane w hodowli komórek HAEC? Czy wyniki z pomiaru oddychania tym aparatem były przeliczane na mg białka?
3. Rys. 4.7. i 4.28. Pokazano tylko zmiany % względem kontroli oddychania podstawowego, oddychania w obecności oligomycyny i CCCP (Rys. 4.7) lub zmiany zapasowej pojemności oddechowej i wydajności sprzęgania mitochondriów (Rys. 4.28). Dla dokładniejszej analizy, np. oceny oddychania związanego z syntezą ATP, przeciekiem H^+ czy rezerwą oddechową (Rys. 4.7) powinny być pokazane pomiary wyjściowe (szybkość oddychania podstawowego, oddychania w obecności oligomycyny i CCCP).
4. Oddychanie beztlenowe oceniano poprzez oznaczenie poziomu mleczanu we frakcji komórkowej (z pominięciem frakcji pozakomórkowej). Czy mierzono poziom dehydrogenazy mleczanowej (LDH)? Dlaczego nie pokazano i nie zanalizowano pomiaru zakwaszania pozakomórkowego (ECAR), który w aparacie Seahorse towarzyszy pomiarowi zużycia tlenu? Analizy te byłyby pomocne w ocenie szybkości glikolizy i oddychania beztlenowego w komórkach.

5. Brakuje informacji czy pomiar ilości badanych białek metodą Western blot był normalizowany względem aktywności.
6. Nie jest jasne czy wyniki pomiaru poziomu reaktywnych form tlenu po wyciszeniu genu *NNMT* przedstawione na Rys. 4.21 dotyczą warunków bez LPS czy z LPS (tak jak na Rys. 4.20). Ponadto autorka nie odnosi się do tych wyników w tekście rozdziału Wyniki.
7. W pracy oznaczano masę mitochondrialną w komórkach śródbłonna ale nie oznaczano markerów biogenezy mitochondriów. Czy biogeneza mitochondriów zmienia się pod wpływem LPS i/lub wyciszania genu *NNMT*?
8. W pracy oznaczano poziom nukleotydów adeninowych. Czy zmienia się ładunek energetyczny ($= [ATP] + 0,5 [ADP] / [ATP] + [ADP] + [AMP]$) komórek śródbłonna pod wpływem LPS i/lub wyciszania genu *NNMT*?
9. Czy w komórkach śródbłonna pod wpływem LPS i/lub wyciszenia genu *NNMT* zmienia się potencjał oksydoredukcyjny wyrażony stosunkiem $NAD^+/NADH$?

6. Inne spostrzeżenia dotyczące treści lub formy rozprawy:

Praca została napisana zwięzłym i przystępnym językiem, choć można w niej znaleźć liczne literówki, błędy stylistyczne i redakcyjne. Wymienię niektóre z nich:

- Wstęp. W niektórych fragmentach tekstu (np. str. 18, 19, 27) cytowania pojawiają się dopiero na koniec akapitu a nie po pierwszym zdaniu, którego dotyczą. W całym Wstępie jest tylko 1 rycina. Przydałby się np. rycina pokazująca budowę LPS czy schemat pokazujący etapy stanu zapalnego (czy sepsy).
- Punkt 3.4.5. Niezręczne słownictwo: np. „przeciwciała drugorzędowe anty-mysz lub anty-królik”
- Brak konsekwencji w stosowaniu skrótów (np. LPS, RFT).
- Rys.4.8 i 4.29. Wśród użytych skrótów oznaczanych metabolitów nie opisano „Mal” (zapewne jabłczan).
- Niestaranie przygotowany spis literatury: Brak konsekwencji w podawaniu nazw czasopism, które podawane są czasami pełnymi nazwami, czasami skrótami, czasami kursywą. Podobnie, niektóre tytuły artykułów zapisane są w całości z dużej litery a większość – nie.

Uwagi, o których wspominam powyżej z obowiązku recenzenta nie wpływają na moją pozytywną ocenę przedstawionej pracy, jej wartości merytorycznej oraz znaczenia przeprowadzonych badań.

7. Ocena końcowa:

Podsumowując, oceniana rozprawa doktorska stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, prezentuje ogólną wiedzę teoretyczną Kandydatki a także wskazuje na jej umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Stwierdzam zatem, że recenzowana rozprawa doktorska mgr Oksany Stępińskiej spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2023 r. poz. 742. z późn. zm.). W związku z powyższym, wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Biologii Doświadczalnej o dopuszczenie mgr Oksany Stępińskiej do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne.



28.03.2025

Prof. dr hab. Wiesława Jarmuszkiewicz



WARSZAWSKI
UNIwersytet
MEDYCZNY



ZAKŁAD BIOCHEMII I ŻYWIENIA

Warszawa, 07 kwietnia 2025 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej

„Rola N-metylotransferazy nikotynoamidowej w odpowiedzi metabolicznej komórek śródbłonna wywołanej lipopolisacharydem”

autorstwa mgr Oksany Stępińskiej

Praca doktorska mgr Oksany Stępińskiej została wykonana pod kierunkiem prof. dr hab. Krzysztofa Zabłockiego w Pracowni Metabolizmu Komórki Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN. Opisane w niniejszej rozprawie badania były częściowo finansowane w ramach konsorcyjnego projektu badawczego Narodowego Centrum Nauki 2015/19/B/NZ3/02302 „Rola N-metylotransferazy nikotynoamidowej (NNMT) i mechanizmów mitochondrialnych w dysfunkcji śródbłonna”.

Rozprawa doktorska mgr Oksany Stępińskiej podejmuje zagadnienia istotne zarówno dla nauki, jak i dla praktyki klinicznej. Temat pracy ma wymiar wieloaspektowy, ale analiza wpływu lipopolisacharydu (LPS) na komórki śródbłonna naczyniowego oraz roli N-metylotransferazy nikotynoamidowej w odpowiedzi biologicznej na LPS ma szczególnie istotne znaczenie dla zrozumienia mechanizmów patofizjologicznych sepsy, lepszej znajomości biologii śródbłonna, w tym metabolizmu energetycznego tych komórek oraz dla oceny N-metylotransferazy nikotynoamidowej jako potencjalnego celu terapeutycznego.

ul. Banacha 1 B
02-091 Warszawa
www.wum.edu.pl

katarzyna.kozia@wum.edu.pl

W literaturze istnieje ograniczona liczba badań dotyczących roli N-metylotransferazy nikotynoamidowej w regulacji odpowiedzi zapalnej i w sepsie. Rozprawa wypełnia tę lukę, dostarczając rzetelnych danych uzyskanych w eksperymentalnych modelach, w których do wyciszenia genu *NNMT* zastosowano metodologię małych interferujących RNA (siRNA). Rozprawa Doktorantki ma szczególne znaczenie praktyczne, wynikające z potencjału związanego z możliwością opracowania nowych strategii terapeutycznych w leczeniu stanów zapalnych i sepsy poprzez modulację aktywności *NNMT*. Warto przypomnieć, że co roku na świecie dochodzi do 47–50 milionów przypadków sepsy, z tego 11 milionów osób umiera, co stanowi prawie 20% wszystkich zgonów na świecie. W Europie to około 3 miliony przypadków rocznie, z czego około 680 tys. kończy się zgonem. Brakuje dokładnych krajowych statystyk, ale szacuje się, że w Polsce liczba przypadków jest porównywalna do krajów UE, czyli około 70–100 tysięcy rocznie, z wysoką śmiertelnością. Sepsa to główna przyczyna zgonów wśród pacjentów OIOM i od 30 do 50% wszystkich przypadków leczenia na oddziałach intensywnej terapii.

Rozprawa jest napisana zgodnie z zasadami akademickimi i ma charakter monografii. Struktura pracy jest przejrzysta i spójna, z wyraźnym podziałem na Wstęp, Założenia i cel pracy, Materiał i metody, Wyniki, Dyskusję, Podsumowanie, Wnioski oraz Piśmiennictwo obejmujące 254 pozycji. Rozdziały te poprzedza wykaz skrótów stosowanych w pracy, a także informacja o publikacji części wyników rozprawy w artykule „Lipopolysaccharide affects energy metabolism and elevates nicotinamide N-methyltransferase level in human aortic endothelial cells (HAEC)” (Stępińska, O., Dymkowska, D., Mateuszuk, Ł., Zabłocki, K.; The international journal of biochemistry & cell biology, 2022). We publikacji tej Doktorantka jest pierwszą autorką.

Wstęp do pracy jest obszerny i logicznie zorganizowany. Mgr Oksana Stępińska skupiła się w tej części pracy na omówieniu roli śródbłónka naczyniowego jako ważnego narządu endokrynnego, regulującego m.in. ciśnienie tętnicze krwi, hemostazę oraz odpowiedź zapalną uwzględniając ważną rolę mitochondriów w prawidłowym funkcjonowaniu tych komórek. Zwróciła uwagę także na barierową funkcję śródbłónka, jako komórki stanowiących jedną z pierwszych linii obrony przed patogenami krążącymi w krwi. Opisując działanie LPS jako



czynnika indukującego odpowiedź zapalną, Autorka podkreśliła złożoność mechanizmów jego działania, w tym interakcje z receptorami powierzchniowymi. Na tym tle opisany został enzym N-metylotransferaza nikotynoamidowa (NNMT). To bardzo ciekawy i coraz lepiej poznany enzym, który odgrywa istotną rolę w metabolizmie energetycznym, regulacji epigenetycznej i chorobach przewlekłych, w tym nowotworach i chorobach zapalnych. Doktorantka przedstawiła jego rolę w wątrobie i tkance tłuszczowej, w stanach zapalnych i chorobach nowotworowych, a także w śródbłonku naczyń krwionośnych. Zwróciła jednak uwagę na to, że choć udokumentowana jest rola tego enzymu w fizjologii naczyń krwionośnych, to nadal nieznane pozostają jego losy w obecności czynników prozapalnych i wywołujących stres komórkowy. Wstęp bardzo dobrze wprowadza w tematykę pracy, pozwala na zrozumienie teoretycznego tła pracy oraz ułatwia czytelnikowi śledzenie założeń badawczych.

W części Założenia i cel pracy przedstawiona została hipoteza badawcza, zgodnie z którą LPS wywołuje w komórkach śródbłonka aorty człowieka zmiany w ich metabolizmie, prowadzi także do zwiększenia ilości N-metylotransferazy nikotynoamidowej (NNMT). Z przyjętą hipotezą powiązane zostały trzy precyzyjnie sformułowane, logiczne i spójne z zakresem przeprowadzonych badań cele pracy. Obejmowały one opisanie skutków metabolicznych traktowania komórek HAEC lipopolisacharydem i ustalenie, jaki jest wpływ takiego traktowania na ilość białka NNMT w komórkach, ustalenie związku między obecnością białka NNMT a aktywnością metaboliczną komórek HAEC traktowanych LPS oraz zbadanie czy wyciszenie genu kodującego *NNMT* ma wpływ na inne procesy komórkowe niezwiązane bezpośrednio z metabolizmem energetycznym. Wybór tych celów świadczy o umiejętności identyfikowania najważniejszych problemów badawczych i jest odzwierciedleniem podjętej przez Doktorantkę próby kompleksowego rozwiązania analizowanego problemu.

W rozdziale Materiał i metody zawarty jest szczegółowy opis wybranego modelu doświadczalnego, bardzo różnorodnych, nowoczesnych technik wykorzystanych przez Doktorantkę w trakcie badań oraz metod analizy statystycznej. Na podkreślenie zasługuje szeroki wachlarz technik badawczych świadczący o doskonałych umiejętnościach laboratoryjnych mgr Oksany Stępińskiej. Wyciszenie genu *NNMT* metodą si-RNA, pomiar



masy mitochondrialnej, pomiar potencjału wewnętrznej błony mitochondrialnej i ocena pojemnościowego napływu wapnia to tylko niektóre z technik wykorzystane przez Doktorantkę dla osiągnięcia założonych celów.

Kluczowym elementem rozprawy są wyniki badań, które zostały przez Doktorantkę zaprezentowane przejrzyście, z użyciem rycin, które znacząco ułatwiają lekturę tej części pracy. Zaprezentowane dane dostarczają wielu nowych informacji na temat złożoności odpowiedzi komórkowej indukowanej w śródbłonku aorty przez LPS, a zwłaszcza na temat roli N-metylotransferazy nikotynoamidowej (NNMT) jako regulatora tych procesów. W komórkach z eksperymentalnie wyciszonym genem *NNMT* stwierdzono m. in. różnice w dynamice zmian architektury sieci mitochondrialnej komórek traktowanych LPS, znaczące zmniejszenie zależnego od LPS wzrostu zawartości niektórych białek związanych z dynamiką mitochondriów i dysmutazy miedziowo/cynkowej, zmniejszenie zależnego od LPS spadku wielkości zapasowej pojemności oddechowej, a także szybszy powrót do stanu początkowego profilu metabolitów glikolizy i cyklu Krebsa zmienionych pod wpływem LPS i ochronę przed nadmiernym obniżeniem poziomu ATP oraz modyfikację zmienionego pod wpływem LPS profilu białek związanych z autofagią i odpowiedzią na stres retikulum endoplazmatycznego (UPR). Zwięzłe, dwustronicowe podsumowanie przeprowadzonych analiz stanowi odrębny rozdział rozprawy.

Wszystkie uzyskane wyniki zostały poddane dogłębnej i dojrzałej dyskusji. Jej lektura wskazuje na dobrą znajomość zagadnień związanych z tematyką pracy, zdolność do krytycznej analizy własnych obserwacji w oparciu o dane literaturowe i osadzenie badań w kontekście aktualnych trendów naukowych.

Wnioski sformułowane przez Doktorantkę są logiczne, precyzyjne i w pełni wynikają z przeprowadzonych badań.

Ostatnim rozdziałem rozprawy doktorskiej jest bogata, zawierająca 254 pozycje bibliografia.

W trakcie lektury rozprawy nasunęło mi się kilka pytań i uwag do Autorki.

- 1) Celem badań prowadzonych przez Doktorantkę było lepsze poznanie funkcji N-metylotransferazy nikotynoamidowej w komórkach śródbłonka narażonych na



działanie LPS. Do eksperymentów wykorzystane zostały komórki śródbłonna ludzkiej aorty. Nie jest jednak jasne, dlaczego w rozważaniach pominięte zostały komórki śródbłonna naczyń żylnych (we Wnioskach pojawia się odniesienie do komórek HUVEC, ale jest to prawdopodobnie omyłka pisarska). Doktorantka nie odniosła się w rozprawie do różnic między śródbłonkiem naczyń żylnych i tętniczych, wynikających z adaptacji do różnych warunków hemodynamicznych oraz funkcji w układzie krążenia, a wyrażających się m. in. w ekspresji genów w odpowiedzi na bodźce zapalne.

- 2) W rozprawie znajdują się odniesienia do wcześniej publikowanych prac wykorzystujących inhibitory NNMT. Czy żaden ze znanych inhibitorów stosowanych w modelach eksperymentalnych w terapii nowotworowej, w leczeniu cukrzycy i zaburzeń metabolicznych czy chorobach neurodegeneracyjnych, np. 5-metylocholina, JBSNF-000028 czy związki α -chloroacetamidowe, nie mógłby być wykorzystany do badań z komórkami śródbłonna?
- 3) Co skłoniło Doktorantkę do wyboru metody wyciszenia genu NNMT opartej o siRNA? Czy wątpliwości dotyczące interpretacji wyników wynikające z wyciszenia genu NNMT (jest o tym mowa w rozprawie) mogłyby zostać rozstrzygnięte w eksperymentach z wykorzystaniem inhibitorów?

Mimo moich uwag, wartość poznawcza i praktyczna uzyskanych wyników jest nie do przecenienia.

Podsumowując, rozprawa doktorska pani mgr Oksany Stępińskiej jest doskonałym opracowaniem oryginalnego problemu badawczego. Autorka wyróżnia się dbałością o wnikliwą i rzetelną prezentację, interpretację i dyskusję wyników badania, a także umiejętnością pisania tekstów naukowych. Dzięki swojej dociekliwości badawczej oraz solidnemu przygotowaniu warsztatowemu, które pozwoliło jej na zaplanowanie i przeprowadzenie eksperymentów z właściwie dobraną metodyką, Doktorantce udało się opisać szereg nieznanych dotychczas elementów odpowiedzi komórek śródbłonna na lipopolisacharyd, poszerzyć rozumienie patogenezы sepsy, a także uzupełnić lukę w badaniach dotyczących roli, jaką w opisywanych procesach pełni NNMT i wskazać potencjał aplikacyjny swoich osiągnięć.



Stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska spełnia warunki określone art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 roku Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce (Dz.U. z 2023 r. poz. 742 z późn. zm.). W związku z powyższym wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Biologii Doświadczalnej o dopuszczenie pani mgr Oksany Stępińskiej do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora.

Katarzyna Koziak





Prof. dr hab. Ewa Słomińska
Katedra i Zakład Biochemii
eslom@gumed.edu.pl

SEKRETARIAT DYREKTORA
WPŁYNĘŁO

2025 -05- 06

L. dz. *DN. 413.15.2025*

Gdańsk, 2025.04.02

Rada Naukowa

Instytutu Biologii Doświadczalnej

im. Marcelego Nenckiego

Polska Akademia Nauk

Recenzja

rozprawy doktorskiej **mgr Oksany Stępińskiej** pt. „Rola N-metylotransferazy nikotynoamidowej w odpowiedzi metabolicznej komórek śródbłonna wywołanej lipopolisacharydem”

Temat przesłanej do oceny rozprawy doktorskiej jest aktualny i ważny ze względów poznawczych. Od kilkunastu lat trwają intensywne badania nad metabolizmem NAD. Nukleotyd ten stał się bardziej interesujący po odkryciu, że jest to związek biorący udział nie tylko w reakcjach redoks, ale także jako substrat kilku ważnych enzymów, w tym: polimerazy poli(ADP-rybozy) czy sirtuin. W wyniku działania tych enzymów z NAD powstaje nikotynamid, który w komórkach ma trzy możliwe ścieżki przemian: a) służyć do resyntezy NAD, b) być wykorzystywany do syntezy rybozydu nikotynamidu i c) brać udział jako substrat w reakcji katalizowanej przez N-metylotransferazę nikotynamidu (N-metylotransferazę nikotynoamidową; NNMT). To właśnie badania nad ostatnim wymienionym enzymem stanowią temat przedstawianej mi do oceny rozprawy doktorskiej.

Rozprawa doktorska ma typowy układ dla monografii, zawiera: *Spis treści, Wykaz skrótów, Streszczenie, Wstęp, Założenia i cel pracy, Metodologię, Wyniki, Dyskusję, Podsumowanie, Wnioski, Piśmiennictwo.*

Wstęp obejmujące 18 stron. Przedstawiono w nim wyczerpujące kompendium wiedzy na tematy bezpośrednio związane z rozprawą. *Wstęp* rozpoczyna opis komórek śródbłonna i ich funkcje, następnie przedstawiono lipopolisacharyd (LPS) jako czynnik wywołujący sepsę i rolę komórek śródbłonna w tym zaburzeniu. Przedstawiono także wyczerpujący stan wiedzy na



temat NNMT. Z przedstawionych danych wynika, że enzym ten jest zaangażowany w wiele procesów zachodzących między innymi w wątrobie, tkance tłuszczowej, mózgu, mięśniach. Obecność tego enzymów badano także w stanach patologicznych, np. w stanach zapalnych czy nowotworowych. We *Wstępie* przedstawiono także informacje o roli NNMT w komórkach śródbłonna, z których wynika, że N-metylonikotynamid (MNA) pełni pozytywną rolę dla układu sercowo-naczyniowego.

Efekty działania samego MNA są już poznane, jednak pomimo wielu badań niewiele wiadomo na temat czynników, które mogą aktywować ten enzym, wpływać na jego ilość w komórkach śródbłonna. Nie wiadomo, czy zmiana ilości/aktywności NNMT jest związana bezpośrednio z bioenergetyką tych komórek. A zatem postawiona hipoteza badawcza jest w pełni uzasadniona.

Biorąc pod uwagę metodykę pracy, to Doktorantka zastosowała wiele złożonych i nowoczesnych technik badawczych z zakresu biologii molekularnej (Western Blot, wyciszenie genu), immunocytochemii, wysokosprawnej chromatografii cieczowej, spektrometrii mas, a także metod pozwalających na wykrywanie reaktywnych form tlenu, pomiaru potencjału wewnętrznej błony mitochondrialnej czy pomiaru szybkości zużywania tlenu. Opis metodyczny jest wyczerpujący. Sposób przeprowadzenia doświadczeń jest poprawny, tylko jeden aspekt metodyczny budzi moje wątpliwości. Chodzi o używanie pożywki zawierającej nieznane stężenie nikotynamidu przy badaniu aktywności NNMT. W moim przekonaniu powinno się zastosować pożywkę nie zawierającą nikotynamidu i dodać ten związek w stężeniu optymalnym do badania aktywności NNMT. Poproszę o komentarz.

Szkoda, że hipoteza badawcza była weryfikowana tylko na jednym modelu badawczym - komórkach pierwotnych śródbłonna aorty człowieka (HAEC). Nasuwa się pytanie – co spowodowało wybranie tej linii komórkowej?

Wyniki badań przedstawiono na 41 stronach monografii, w tym zamieszczono 43 ryciny. Strona graficzna i opis rycin są przedstawione poprawnie i czytelnie.

Przedstawione wyniki można podzielić na dwie części. Pierwsza dotyczy wpływu LPS na poziom białek związanych ze stresem oksydacyjnym i indukcji stanu zapalnego, na wielkość masy mitochondrialnej, na zawartość metabolitów glikolizy i kwasów trójkarboksylowych, na zawartość nukleotydów adeninowych oraz ilość NNMT w komórkach HAEC.

Do tej części nasuwa się jednak kilka pytań i spostrzeżeń:

- 1) Czym można wytłumaczyć obniżenie poziomu białek COX-2 i VCAM-1 po 24h inkubacji z 100 ng/ml LPS w porównaniu do wartości obserwowanych po 6h inkubacji?
- 2) Czym można wytłumaczyć wzrost mleczanu/pirogronianu i metabolitów cyklu Krebsa po 24h inkubacji z LPS przy niezmienionej masie mitochondrialnej?



- 3) W oparciu o przedstawione wyniki zawartości nukleotydów adeninowych jako % kontroli trudno wyciągnąć wnioski o wpływie LPS na metabolizm energetyczny komórek. Proszę przestawić jakie były wartości stężenia ATP, ADP i AMP w komórkach kontrolnych i inkubowanych z LPS.

Obserwowany wzrost stężenia AMP może odpowiadać za aktywację kinazy AMP-zależnej (AMPK), ale dlaczego wtedy ilość ufosforylowanej karboksylazy acetyloCoA (ACC) jest mniejsza po 24h niż po 6h inkubacji?

Druga część wyników dotyczy obserwowanych zmian po wyciszeniu genu kodującego NNMT. Zaskakująca jest obserwacja, że po zastosowaniu tzw. *scrambled* RNA zwiększeniu ulega ilość NNMT w komórkach HAEC inkubowanych z LPS, co skutkuje także innymi zmianami.

Wyciszenie genu kodującego NNMT spowodowało obniżenie ilości reaktywnych form tlenu przy wzroście głównie manganowej dysmutazy ponadtlenkowej (MnSOD) i braku wpływu na Cu/ZnSOD. Brak wpływu wyciszenia tego genu obserwuje się także w przypadku zawartości białek adhezji komórkowej (ICAM-1 i VCAM-1). Wydaje się, że najciekawszą obserwacją w komórkach z wyciszonym genem NNMT inkubowanych z LPS jest zahamowanie jego negatywnego wpływu, np. na wielkość zapasowej pojemności oddechowej, poprawa profilu metabolitów glikolizy i cyklu Krebsa, zachowanie stężenia ATP, ograniczenie pojemnościowego napływu jonów wapnia, utrzymanie stopnia fosforylacji eNOS, modyfikację profilu białek związana z autofagią.

Są to wyniki ciekawe i wskazujące na rolę NNMT w badanych procesach. Do rozważenia (jak zresztą zauważa Doktorantka w dyskusji) są dalsze badania nad zahamowaniem aktywności NNMT w przypadku sepsy.

Na podstawie informacji zamieszczonej na początku rozprawy doktorskiej wynika, że duża część uzyskanych przez Doktorantkę wyników została już opublikowana i to w prestiżowym czasopiśmie (*International Journal of Biochemistry and Cell Biology*). W ocenie recenzenta jest to duże osiągnięcie Doktorantki, powinno być podkreślone i wyraźnie zaznaczone przy prezentowanych wynikach.

Równocześnie z przedstawionymi rezultatami badań przeprowadzona jest dyskusja wyników. Jest ona ciekawa i dobrze napisana. Oceniając dyskusję mogę stwierdzić, że otrzymane wyniki zostały przez Doktorantkę dobrze przedyskutowane i skonfrontowane z danymi z piśmiennictwa, a ich interpretacja jest wnikliwa, ostrożna i bardzo krytyczna. Świadczy to o dobrej znajomości poruszanej w pracy problematyki, ocenie ograniczonych możliwości doświadczalnych oraz dobrej znajomości piśmiennictwa w zakresie prowadzonych badań.



Na zakończenie rozprawy przedstawiono najważniejsze wnioski z uzyskanych wyników. Wnioski są prawidłowo sformułowane i w pełni udokumentowane wynikami przeprowadzonych doświadczeń.

Piśmiennictwo zawiera 254 pozycje, stanowiące bardzo wnikliwy przegląd dostępnych informacji bezpośrednio związanych z badanym zagadnieniem.

Kończąc recenzję chciałabym wskazać drobną sugestię, mianowicie w przypadku badania aktywności NNMT a szczególnie analizy stężenia MNA należy także zwrócić uwagę na produkty jego dalszej przemiany: N-metylo-2-pirydono-5-karboksyamidu (Met-2PY) i N-metylo-3-pirydono-4-karboksyamidu (Met-4PY). Są to metabolity powstające z MNA przy udziale oksydazy aldehydowej i przemiana ta zachodzi także w komórkach śródbłónka. Szybkość tej przemiany zależy głównie od stężenia MNA. A zatem badając aktywność NNMT należy brać pod uwagę również produkcje wymienionych powyżej związków, bądź zablokować aktywność oksydazy.

Niemniej jednak te drobne uwagi nie umniejszają wartości uzyskanych wyników dotyczących roli NNMT w komórkach śródbłónka poddanych działaniu lipopolisacharydu.

W podsumowaniu stwierdzam, że mgr Oksana Stępińska jest w pełni ukształtowanym pracownikiem naukowym, posługującym się wieloma technikami badawczymi, zdolnym do rozwiązywania skomplikowanych problemów badawczych. Jej rozprawa doktorska ma charakter oryginalnej, bardzo dobrej pracy doświadczalnej. W mojej ocenie rozprawa doktorska mgr Oksany Stępińskiej spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2023r. poz. 742 z późn. zm.). W związku z powyższym, wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Biologii Doświadczalnej o dopuszczenie mgr Oksany Stępińskiej do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora.

Z poważaniem

Prof. dr hab. Ewa Słomińska