



nencki institute
of experimental biology

POLISH ACADEMY OF SCIENCES
NENCKI INSTITUTE OF EXPERIMENTAL BIOLOGY

Pasteur 3, 02-093 Warsaw, Poland
Phone: (48-22) 589 22 07; Fax: (48-22) 822 53 42
E-mail: sekretariat@nencki.edu.pl; <http://www.nencki.edu.pl>

Prof. dr hab. Mariusz R. Więckowski,
Pracownia Biologii Mitochondriów i Metabolizmu
Instytut Biologii Doświadczalnej PAN
im. M. Nenckiego w Warszawie

Warszawa, 28 września 2025 r.

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr **Adrianny Budzińskiej**

p.t.: "Wpływ bisfosfonianów stosowanych w terapii osteoporozy na metabolizm tlenowy komórek śródbłonna"

Rozprawa doktorska Pani Adrianny Budzińskiej została przygotowana pod opieką naukową prof. dr hab. Wiesławy Jarmuszkiewicz, na Uniwersytecie im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, Wydział Biologii, Instytut Biologii Molekularnej i Biotechnologii.

Celem pracy doktorskiej mgr Adrianny Budzińskiej było określenie wpływu dwóch leków należących do grupy związków zawierających azot i zmniejszających tempo resorpcji kości (N-BPs): zoledronianu (Zol) i alendronianu (Ale), na metabolizm tlenowy komórek śródbłonna. Modelem badawczym wykorzystanym przez Doktorantkę były komórki ludzkiego śródbłonna EA.hy926 oraz izolowane z nich mitochondria. W swojej pracy Doktorantka postawiła sobie trzy główne cele badawcze:

1. Opis zmian w metabolizmie tlenowym komórek śródbłonna hodowanych w obecności N-BPs w odniesieniu do zawartości CoQ, produkcji RFT, oraz dynamiki mitochondriów – badania na poziomie komórkowym
2. Opis zmian w aktywności bioenergetycznej mitochondriów izolowanych z komórek śródbłonna hodowanych w obecności N-BPs w odniesieniu do zawartości/stopnia redukcji mtCoQ, produkcji mtRFT oraz molekularnej organizacji łańcucha oddechowego – badania na poziomie izolowanych mitochondriów; oraz

4. Podsumowanie i opisanie wpływu leków zmniejszających tempo resorpcji kości z grupy związków zawierających azot na szlak mewalonowy. W pracy opisano ich działanie na poziomie komórkowym i na poziomie mitochondriów.

Formalny opis rozprawy

Przedstawiona mi do recenzji praca Pani mgr Adrianny Budzińskiej stanowi zbiór 3 artykułów naukowych opublikowanych w latach 2023-2025. We wszystkich trzech publikacjach (dwie prace eksperymentalne i jedna praca przeglądowa), Pani mgr Adrianna Budzińska jest pierwszym autorem.

1. **Budzinska A**, Galganski L, Jarmuszkiewicz W. The bisphosphonates alendronate and zoledronate induce adaptations of aerobic metabolism in permanent human endothelial cells. *Sci Rep.* 2023 Sep 27;13(1):16205. doi: 10.1038/s41598-023-43377-3. PMID: 37758809 (IF5y 4,3),
2. **Budzinska A**, Galganski L, Wojcicki K, Jarmuszkiewicz W. Adaptation of mitochondrial bioenergetics to coenzyme Q deficiency in human endothelial cells after chronic exposure to bisphosphonates. *Sci Rep.* 2025 May 22;15(1):17734. doi: 10.1038/s41598-025-02710-8. PMID: 40404831; (IF5y 4,3),
3. **Budzinska A**, Jarmuszkiewicz W. The Cellular and Mitochondrial Consequences of Mevalonate Pathway Inhibition by Nitrogen-Containing Bisphosphonates: A Narrative Review. *Pharmaceuticals (Basel).* 2025 Jul 11;18(7):1029. doi: 10.3390/ph18071029. PMID: 40732317;

Należy podkreślić, że wszystkie trzy prace wchodzące w skład rozprawy doktorskiej są ściśle powiązane tematycznie. Zostały one opublikowane w czasopismach naukowych znajdujących się na listach MNiSW (indeksowanych w bazie PubMed), oraz znajdujących się na liście filadelfijskiej (JCR). Łączna wartość wskaźnika oddziaływania (5-year IF) tych prac wynosi 13,5, zaś łączna punktacja MNiSW to 380 pkt.

Zgodnie z oświadczeniem doktoranta jego udział w powstaniu wyżej wymienionych prac był istotny i obejmował:

- w publikacji 1 i 2 – udział w opracowaniu koncepcji badań, przeprowadzenie większości doświadczeń, analizę danych, współudział w pisaniu, przygotowaniu figur, i edycji manuskryptu.
- w publikacji 3 przygotowanie przeglądu literatury oraz napisanie pierwszej wersji manuskryptu,

Pani mgr Adrianna Budzińska jest również współautorem sześciu innych publikacji naukowych nie wchodzących w skład rozprawy doktorskiej co pokazuje duże jej zaangażowanie w prowadzenie badań naukowych.

Badania przedstawione w rozprawie doktorskiej Pani mgr Adrianny Budzińskiej zrealizowano w ramach projektów finansowanych przez:

- 1) Narodowe Centrum Nauki (grant OPUS11 2016/21/B/NZ3/00333; kierownik prof. dr hab. Wiesława Jarmuszkiewicz, promotor Doktoranta)
- 2) Narodowe Centrum Nauki (grant OPUS19 NCN (2020/37/B/NZ1/01188; kierownik prof. dr hab. Wiesława Jarmuszkiewicz, promotor Doktoranta)

Całość badań została wykonana przez Doktorantkę na Uniwersytecie im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, na Wydział Biologii, w Instytucie Biologii Molekularnej i Biotechnologii.

Ocena poszczególnych rozdziałów pracy:

Struktura pracy jest typowa dla tego typu opracowań. Rozprawę doktorską uzupełniają oświadczenia Doktorantki i współautorów publikacji składających się na rozprawę doktorską, kopie artykułów składających się na zbiór publikacji, oraz lista 6 publikacji niewchodzących w skład rozprawy Doktorskiej, w których Doktorantka jest współautorem.

Przedstawiona do recenzji praca obejmuje 93 strony. Rozprawa doktorska zawiera streszczenie w języku polskim i angielskim. Całość podzielona jest na rozdziały: Wprowadzenie wraz ze Spisem Literatury (4 strony), Cele Pracy (1 strona), Omówienie Wyników (13 stron), Podsumowanie Wyników i Wnioski (3 strony). W pracy cytowanych jest 9 pozycji literaturowych (poza jedną publikacją), z ostatnich dziesięciu lat.

W związku z tym, że prace wchodzące w skład rozprawy doktorskiej zostały już poddane dogłębnej analizie na etapie recenzji przed ich publikacją w czasopismach naukowych, pozwolę sobie przedstawić następujące uwagi, które chciałbym przedyskutować z Doktorantką podczas obrony.

Wstęp rozprawy doktorskiej jest napisany w sposób rzeczowy i syntetyczny. Według mnie mógłby być trochę bardziej rozbudowany, chociażby o bardziej szczegółowy opis szlaku mewalonowego i jego regulacji. Recenzent zdaje sobie sprawę z faktu, iż część tych informacji może być odnaleziona w pracy przeglądowej wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej. We wspomnianej pracy, autorzy skupili się jednakże na wpływie N-BP na różne

aspekty fizjologii komórki. Dodatkowo, wstęp mógłby zawierać więcej informacji, chociażby na temat roli mitochondriów w sygnalizacji komórkowej w komórkach śródbłónka. Mam także prośbę o doprecyzowanie, co Doktorantka miała na myśli pisząc, że jak dotąd nie badano dysfunkcji mitochondriów wywołanej przez N-BPs, w kontekście mechanizmów kontroli jakości mitochondriów. Jakie mechanizmy Doktorantka miała na myśli.

Trzy **szczegółowe cele** pracy doktorskiej mgr Adrianny Budzińskiej zostały określone bardzo precyzyjnie i w pełni zostały zrealizowane.

Wprowadzenie

Do tej części rozprawy mam następujące uwagi:

Doktorantka w ostatnim zdaniu czwartego akapitu pisze: „Nadmiar RFT prowadzi do stresu oksydacyjnego, który może przyczyniać się do starzenia komórek czy powstawania różnych chorób”. Wydaje mi się, że zadanie to powinno być bardziej precyzyjne, sama, bowiem, nadmierna produkcja RFT nie zawsze prowadzi do zaistnienia stresu oksydacyjnego. Dopiero zaburzenie równowagi pomiędzy szybkością powstawania RFT, a tempem ich usuwania (zmniejszona ochrona antyoksydacyjna), może doprowadzić do powstania w komórce stanu opisywanego jako stres oksydacyjny.

Omówienie wyników Badań:

Do tej części rozprawy mam następujące uwagi:

Publikacja 1

- Strona 11. Akapit drugi:; Doktorantka pisze: „że wyższe stężenia (od 7,5 μ M dla Ale i 2,5 μ M dla Zol), obniżały żywotność komórek śródbłónka.” Mam pytanie czy w analizie uwzględniono tylko komórki przylegające, bowiem opis metody w załączonej publikacji jest niepełny. Czy brano pod uwagę martwe komórki obecne w medium hodowlanym?
- Strona 11. Akapit trzeci:; Doktorantka pisze: „W komórkach traktowanych N-BPs, odnotowano również 15-20% wzrost poziomu białek antyoksydacyjnych, tj. dysmutazy ponadtlenkowej (SOD1) czy reduktazy glutationowej (GR), co wskazuje na niewystarczającą pulę antyoksydantów w komórkach traktowanych N-BPs i konieczność uruchomienia dodatkowych mechanizmów w celu niwelowania powstałego przez N-BPs stresu oksydacyjnego.” Jakie antyoksydanty (poza zredukowanym CoQ), Doktorantka ma na myśli? Proszę o uszczegółowienie.

- Strona 12. Akapit drugi: Doktorantka pisze: „Przeprowadzona analiza enzymów syntazy cytrynianowej (CS) oraz kompleksu IV (COX), wykazała wzrost zarówno aktywności jak i poziomu obu enzymów (~12-17%), świadczący o zwiększonej pojemności oddechowej cyklu Krebsa i łańcucha oddechowego komórek traktowanych N-BPs.” Czy mogę prosić o wyjaśnienie, co ma na myśli poprzez określenia takie jak: „pojemność oddechowa cyklu Krebsa”, oraz „pojemność oddechowa łańcucha oddechowego” (bardziej elegancko: mitochondrialnego łańcucha transportu elektronów)?
- Na tej samej stronie, akapit trzeci: Doktorantka również pisze, że „Zwiększenie aktywności białek CS oraz COX o ~17% oraz ich poziomu w komórkach poddanych działaniu N-BPs sugeruje, iż zawartość mitochondriów w tych komórkach jest większa.” Natomiast później: informacja dotycząca traktowania Zol: „Jednocześnie, przy zastosowaniu substratów oddechowych takich jak glutamina, pirogronian czy mieszaniny wszystkich użytych w doświadczeniu substratów oddechowych (tj. glukoza, palmitynian, glutamina i pirogronian), zauważono ~20-35% spadek maksymalnej pojemności oddechowej mitochondriów (maksymalna OCR), oraz ~15-20% spadek OCR związanej z produkcją ATP.”

Jak Doktorantka skomentuje spadek maksymalnej OCR przy jednoczesnym wzroście zawartości mitochondriów? Co jest przyczyną takiej zależności? Opisowa część uzyskanych wyników mogła by być bardziej rozbudowana i zawierać więcej szczegółów przedstawionych przecież w dyskusji publikacji „*Budzinska A, Galganski L, Jarmuszkiewicz W. The bisphosphonates alendronate and zoledronate induce adaptations of aerobic metabolism in permanent human endothelial cells. Sci Rep. 2023 Sep 27;13(1):16205*”

- Strona 13. Akapit drugi: Drobną uwagę językową, wydaje mi się, że bardziej poprawne jest użycie określenia „uprzepuszczalnienie” komórek, niż „permeabilizacja”.
- Mam pytanie dotyczące pomiaru szybkości oddychania w komórkach uprzepuszczalnych digitoniną. Na jakiej podstawie została dobrana ilość digitoniny? Czy doktorantka nie obawiała się, że może dojść do „uszkodzenia” zewnętrznej błony mitochondrialnej i utraty cytochromu c?

Najczęściej w tego typu badaniach wykonuje się pomiar kontrolny w obecności rozpręacza, gdzie dodaje się digitoninę. Następnie po dodaniu „optymalnego” stężenia digitoniny dodaje się 1 – 5 mM cyt. c i sprawdza czy po dodaniu cytochromu c szybkość oddychania przypadkiem nie wzrośnie. Jeśli tak jest, świadczy to o uszkodzeniu mitochondriów i tak naprawdę niby maksymalna szybkość zużycia tlenu jest wtedy

ograniczana przez „niedostatek endogennego cyt. c. Reasumując. Czy Doktorantka wykonała pomiar zużycia tlenu w obecności rozpręgacza i 0,02% digitoniny po dodaniu cytochromu c? Jeśli tak, to jaki był wynik takiej kontroli jakości uprzepuszczalniania komórek? W publikacji ani w rozprawie nie znalazłem takiej informacji.

Publikacja 2

- W opisie wyników zaintrygowała mnie obserwacja poczyniona przez Doktorantkę dotycząca szybkości zużycia tlenu w obecności FCCP. Doktorantka zauważyła zwiększoną szybkość zużycia tlenu podczas utleniania kwasu palmitynowego przez mitochondria wyizolowane z komórek traktowanych Ale lub Zol. Doktorantka tłumaczy to zwiększeniem poziomu enzymu: dehydrogenazy acetylo-CoA (ACADS), biorącego udział w początkowych etapach β -oksydacji. W przypadku utleniania bursztynianu wartość ta spada, co tłumaczone jest przez spadek poziomu kompleksu II. Dlaczego tak się dzieje? Acetylo CoA z β -oksydacji „wprowadzany,, jest do cyklu Krebsa wcześniej niż bursztynian. Więc, jeżeli jest problem z wykorzystaniem bursztynianu na etapie cyklu Krebsa, to czy nie powinien on być widoczny z także z acetylo-CoA pochodzącym z β -oksydacji palmitynianu? Dodatkowo później czytamy (strona 21), że aktywność kompleksu III była niższa w mitochondriach komórek traktowanych N-BPs, podczas gdy aktywność kompleksu IV pozostała taka sama. Zauważono również spadek redukcji cytochromów $a+a_3$ (wchodzących w skład kompleksu IV), co wskazuje na obniżenie poziomu hemów a, będących obok CoQ produktami szlaku mewalonowego hamowanego przez N-BPs. Jeżeli więc widzimy zaburzenia na poziomie łańcucha oddechowego, to dlaczego widzimy wzrost szybkości oddychania mitochondriów izolowanych z komórek traktowanych Ale lub Zol gdy substratem jest palmitilokarnityna? W podsumowaniu tej części Doktorantka pisze:” Podsumowując, w komórkach śródbłónka poddanych działaniu Ale lub Zol, dochodzi do upośledzenia funkcjonowania mitochondrialnego łańcucha oddechowego oraz zmniejszenia wydajności fosforylacji oksydacyjnej. N-BPs wywołują istotną reorganizację systemu fosforylacji oksydacyjnej oraz zwiększenie udziału utleniania kwasów tłuszczowych w mitochondriach.” Czy przeprowadzone doświadczenie z palmitoilokarnityną upoważnia do stwierdzenia, że zwiększył się udział utleniania kwasów tłuszczowych w mitochondriach komórek śródbłónka traktowanych Ale lub Zol?

Chciałbym poznać opinię Doktorantki na ten temat - czy takie założenie jest słuszne. W przedstawionej do recenzji rozprawie brakuje mi bardziej rozbudowanej dyskusji

dotyczącej wy tłumaczenia zawilosci wykorzystania przez lancuch oddechowy roznych substratow przez mitochondria izolowane z komorek nablonka traktowanych Ale i Zol.

- Dodatkowo, czy udalo sie zidentyfikowac poziom ktorej klasy dehydrogenazy acetylo-CoA (ACADS) ulegl zwiekszeniu - SCAD, MCAD, LCAD, VLCAD, and VLCAD2? Wszystkich, czy tylko tej odpowiedzialnej za utlenianie kwasow tluszczowych o dlugosci zblizonej do kwasu palmitynowego?

Publikacja 3 - Do pracy przegladowej nie mam uwag ani pytan.

Wniosek koncowy

Podsumowujac, przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska jest napisana dobrze i przedstawia oryginalne odkrycia badawcze. Co prawda mozna by oczekiwac bardziej rozbudowanego wstepu, czy dyskusji nad uzyskanymi wynikami, oraz mechanistycznego podejscia do badanej hipotezy, jednakze przedstawione przeze mnie komentarze oraz uwagi dotyczace rozprawy mgr Adrianny Budzinskiej w wiekszosci maja charakter drugorzędny i w zadnym stopniu nie obnizaja wartosci merytorycznej przedstawionej mi do oceny rozprawy doktorskiej. Sa one jedynie zaproszeniem do dyskusji. Stwierdzam zatem, ze powierzona mi do oceny rozprawa na stopien doktora nauk scislych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne mgr Adrianny Budzinskiej spelnia warunki stawiane rozprawom na stopien doktora nauk scislych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne okreslone w art. 1187 ust. 1-2 Ustawy Prawo o szkolnictwie wyzszy i nauce (Dz. U. z 2024 r. poz. 1571. Zwracam sie wobec tego do Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu z wnioskiem o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapow przewodu doktorskiego. Jednoczesnie biorac pod uwage wysokie walory merytoryczne przedstawionej mi do recenzji rozprawy doktorskiej zgłaszam wniosek do Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu o wyroznienie rozprawy doktorskiej mgr Adrianny Budzinskiej.



Mariusz R. Więckowski