

Recenzja

rozprawy doktorskiej Pani mgr Adrianny Budzińskiej zatytułowana "Wpływ bisfosfonianów stosowanych w terapii osteoporozy na metabolizm tlenowy komórek śródbłónka"

Praca doktorska Pani mgr Adrianny Budzińskiej została wykonana na Wydziale Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, w Instytucie Biologii Molekularnej i Biotechnologii. Promotorem pracy była prof. dr hab. Wiesława Jarmuszkiewicz, uznany ekspert w dziedzinie biochemii mitochondrialnej i bioenergetyki komórkowej.

Osteoporoza to choroba prowadząca do utraty masy kostnej i zwiększonego ryzyka złamań, dotycząca szczególnie osoby starsze. Wraz ze starzeniem się populacji stanowi coraz większe wyzwanie kliniczne. Leczenie osteoporozy opiera się głównie na stosowaniu bisfosfonianów, które hamują aktywność komórek odpowiedzialnych za resorpcję kości poprzez blokowanie szlaku miewalonianowego. Choć bisfosfoniany skutecznie chronią tkankę kostną, mogą również wpływać na inne typy komórek, w tym komórki śródbłónka, które jako pierwsze mają kontakt z lekami podawanymi dożylnie. Badania nad pozaszkietowymi efektami działania bisfosfonianów są zatem kluczowe z perspektywy bezpieczeństwa terapii i jej dalszej optymalizacji.

Rozprawa doktorska Adrianny Budzińskiej koncentruje się na analizie wpływu dwóch powszechnie stosowanych bisfosfonianów, alendronianu i zoledronianu, na metabolizm tlenowy ludzkich komórek śródbłónka. Praca składa się z trzech tematycznie powiązanych publikacji wieloautorskich, opublikowanych w latach 2023–2025 w renomowanych czasopismach naukowych o łącznym współczynniku wpływu wynoszącym 12.5. Dwa z przedstawionych artykułów mają charakter eksperymentalny, natomiast trzeci stanowi opracowanie przeglądowe. Praca przeglądowa, pierwotnie udostępniona jako preprint, została niedawno opublikowana w *Pharmaceuticals*. Publikacje w rozprawie doktorskiej zostały uzupełnione sekcją łączącą, zawierającą streszczenie w języku polskim i angielskim, wprowadzenie, cele pracy, omówienie wyników publikacji oraz podsumowanie wyników i końcowe wnioski. Dołączono również oświadczenia doktorantki i współautorów dotyczące ich wkładu w powstanie cyklu publikacji. Na końcu rozprawy Adrianna Budzińska zamieściła listę swoich pozostałych publikacji, które nie zostały uwzględnione w rozprawie, a które stanowią

dotkające osiągnięcia naukowe doktorantki. Lista obejmuje sześć prac opublikowanych w latach 2022–2024, a łącznym współczynnik wpływu wynoszącym 33.5.

Zgodnie ze spisem treści rozprawa doktorska liczy 95 stron, jednak ostatnia strona została oznaczona jako 93, co wskazuje na drobną nieścisłość w numeracji. „Wprowadzenie” jest krótkie, treściwe i dobrze komponuje się z obszerną pracą przeglądową wchodzącą w skład rozprawy. Zwięźle wyjaśnia pojęcie osteoporozy, mechanizm działania bisfosfonianów oraz wprowadza podstawowe informacje dotyczące koenzymu Q, komórek śródbłónka i funkcji mitochondriów. Identyfikuje również obszary badawcze związane z działaniem bisfosfonianów, które nie zostały jeszcze dostatecznie poznane, ukazując perspektywę dalszych badań. W rezultacie, stanowi solidną podstawę do zrozumienia celów oraz wyników rozprawy. W przeciwieństwie do zwięzłego wprowadzenia rozdział „Cele pracy” jest rozbudowany. Zawiera nie tylko ogólnie sformułowany cel badawczy, ale także trzy konkretne zadania zrealizowane przez doktorantkę, które zaowocowały trzema publikacjami. Wyniki zawarte w tych publikacjach oraz wnioski z nich wyciągnięte są omawiane w następnych rozdziałach.

Istotnym elementem oceny formalnej rozprawy doktorskiej, składającej się z kilku współautorskich publikacji, jest ocena indywidualnego wkładu doktoranta w ich powstanie. Fakt, że mgr Adrianna Budzińska jest pierwszą autorką wszystkich publikacji wchodzących w skład rozprawy, świadczy o jej znaczącej roli w realizacji badań. Jej wiodący wkład potwierdzają również oświadczenia współautorów, wskazujące, że była głównym eksperymentatorem w dwóch publikacjach eksperymentalnych, uczestniczyła również w przygotowaniu koncepcji badań do tych prac, analizie otrzymanych danych oraz przygotowaniu manuskryptów. Trzecia publikacja, artykuł przeglądowy, ma tylko dwóch autorów, a doktorantka była odpowiedzialna za zebranie danych literaturowych i napisanie pierwszej wersji manuskryptu. Analizując wkład doktorantki w powstanie pracy eksperymentalnej z 2023 roku, zauważyłam drobną rozbieżność pomiędzy jej oświadczeniem a informacjami zawartymi w sekcji „Author contributions” publikacji. Zgodnie z „Author contributions” doktorantka uczestniczyła we wszystkich metodach wykorzystanych w tej pracy. Natomiast w swoim oświadczeniu nie wspomina o udziale w analizie żywotności komórek, a wskazuje na udział w izolacji mitochondriów, metodzie, która nie była zastosowana w tej publikacji. Mimo tej nieścisłości, nie budzi wątpliwości fakt, że mgr Adrianna Budzińska była głównym eksperymentatorem tej publikacji.

Omawiana publikacja ukazała się w *Scientific Reports* i opisuje wielokierunkowe badania wpływu dwóch powszechnie stosowanych bisfosfonianów, alendronianu i zoledronianu, na komórki śródbłónka. Wykazano, że nawet stosunkowo niskie stężenia tych

związków, które nie wpływa na żywotność komórek, prowadzi do istotnych zmian metabolicznych. Najbardziej nowatorskim wynikiem tej pracy jest wykazanie, że bisfosfoniany obniżają poziom koenzymu Q w komórkach śródbłónka, zarówno jego formy utlenionej jak i zredukowanej. Skutkuje to zaburzeniem równowagi redoks koenzymu Q, wzrostem produkcji ROS oraz aktywacją mechanizmów antyoksydacyjnych. Ten scenariusz zdarzeń wywołanych przez bisfosfoniany opiera się na wynikach uzyskanych przez doktorantkę, która przeprowadziła pomiary koenzymu Q, ROS oraz enzymów antyoksydacyjnych. Adrianna Budzińska wykazała również, że pomimo wzrostu markerów aktywności mitochondrialnej po inkubacji z bisfosfonianami, poziom ATP w komórkach śródbłónka spada, co wskazuje na nieefektywną fosforylację oksydacyjną. Jednocześnie obserwuje się wzrost aktywności enzymów glikolitycznych i fermentacyjnych, co sugeruje przesunięcie metabolizmu w kierunku beztlenowego. Oba bisfosfoniany zaburzając mitochondrialne wykorzystanie tlenu, prowadzą do wzrostu jego poziomu w komórkach śródbłónka. Zoledronian, w przeciwieństwie do alendronianu, indukuje odpowiedź zapalną komórek śródbłónka. Ciekawym wynikiem otrzymanym przez doktorantkę jest wykazanie, że bisfosfoniany zaburzają dynamikę mitochondriów, zmniejszając ich fragmentację bez wpływu na fuzję.

Chciałabym zapytać, czy rozważano mikroskopową analizę sieci mitochondrialnej w celu potwierdzenia wniosków płynących z zastosowania markerów. Ponieważ większość wniosków opisanych w tej publikacji, w tym dotyczących dynamiki mitochondriów, opiera się na analizie odpowiedzi markerów, prosiłabym o komentarz dotyczący ich specyficzności. Które z zastosowanych markerów charakteryzują się najmniejszą specyficznością? Efekty działania bisfosfonianów obserwowane są po 6 dniowej inkubacji z komórkami śródbłónka. Czy wiadomo, czy są one odwracalne czy prowadzą do trwałych zmian? Proszę o opinie doktorantki w tym zakresie. Mam również pytanie dotyczące rys. 3 z publikacji 1. Na wykresie słupkowym ekspresja ICAM1 po zastosowaniu alendronianu i zoledronianu wydaje się bardzo zbliżona, zarówno pod względem wartości średniej, jak i rozrzutu wyników (SD). Dlaczego zatem tylko dla zoledronianu oznaczono istotność statystyczną? Czy bardzo subtelne zmiany w poziomie markerów zapalnych, obserwowane na rys.3, mogą wskazywać na wczesną fazę odpowiedzi zapalnej, a nie pełnoobjawowy stan zapalny? Czy można tak interpretować otrzymane wyniki ?

Druga praca eksperymentalna (*Scientific Reports*, 2025) wchodzącą w skład rozprawy stanowi kontynuację pierwszej, pogłębiając analizę wpływu bisfosfonianów na metabolizm tlenowy komórek śródbłónka koncentrując się na biochemii i bioenergetyce mitochondriów. W

pracy tej za izolację mitochondriów wykorzystywanych w badaniach była odpowiedzialna doktorantka. Według „Author contributions” Adrianna Budzińska uczestniczyła we wszystkich metodach na izolowanych mitochondriach zastosowanych w tej pracy. Z jej oświadczenia wynika natomiast, że uczestniczyła we wszystkich pracach eksperymentalnych z wyjątkiem BN-PAGE i pomiarów aktywności enzymów w żelu. Mimo tej drobnej nieścisłości nie mam wątpliwości, że głównym eksperymentatorem tej pracy, podobnie jak poprzedniej, była Adrianna Budzińska.

W pracy opublikowanej w 2005 roku Adrianna Budzińska przeprowadzała m.in. takie pomiary jak: ilości i poziom redukcji mitochondrialnego koenzymu Q, potencjału błony mitochondrialnej, zużycia tlenu, produkcji H_2O_2 , redukcji cytochromu $a+a_3$, aktywności systemu rozprzegającego. Otrzymane wyniki wskazują, że ekspozycja komórek śródbłonna na bisfosfoniany prowadzi do znacznego 45–50% spadku poziomu mitochondrialnego koenzymu Q i całkowitego zaniku jego zredukowanej formy, co skutkuje dysfunkcją bioenergetyczną mitochondriów i utratą istotnej puli antyoksydacyjnej w mitochondriach. Towarzyszy temu wzrost poziomu enzymu SOD2 oraz białka rozprzegającego UCP2, co wskazuje na aktywację mechanizmów kompensacyjnych w odpowiedzi na nasilony stres oksydacyjny. Zaburzenia w poziomie mitochondrialnej puli koenzymu Q przekładają się na istotne dysfunkcje bioenergetyczne mitochondriów. Zaobserwowano obniżone tempo oddychania, potencjału błonowego, efektywności fosforylacji oksydacyjnej. Co ciekawe, podczas gdy utlenianie typowych substratów było osłabione, utlenianie kwasów tłuszczowych wzrastało, co sugeruje metaboliczną adaptację komórek do alternatywnych źródeł energii. Wyniki z BN-PAGE elektroforezy wskazują, że bisfosfoniany na poziomie strukturalnym doprowadzają do reorganizacji kompleksów oddechowych. Podsumowując, omawiana publikacja, dostarcza przekonujących dowodów na to, że bisfosfoniany, poprzez hamowanie szlaku miewalonianowego, prowadzą do niedoboru mitochondrialnego koenzymu Q i wtórnych zaburzeń bioenergetycznych w komórkach śródbłonna. Autorzy sugerują, że suplementacja koenzymu Q10 może stanowić obiecującą strategię terapeutyczną, która łagodzi negatywne efekty leku, a w konsekwencji chroni funkcje śródbłonna i ogranicza ryzyko rozwoju chorób sercowo-naczyniowych. W związku z tą sugestią, czy rozważano przeprowadzenie eksperymentów z suplementacją koenzymem Q10 mitochondriów izolowanych z komórek śródbłonna traktowanych bisfosfonianami? Taki eksperyment mógłby potwierdzić hipotezę o przyczynowym związku między niedoborem CoQ a dysfunkcją bioenergetyczną. Proszę doktorantkę o komentarz dotyczący potencjalnych trudności technicznych związanych z takim eksperymentem oraz możliwych sposobów ich przezwyciężenia. Kolejne pytanie dotyczy

spadek poziomu cytochromów $a + a_3$. Czy te zaburzenia mogą mieć konsekwencje biologiczne skoro aktywność kompleksu IV jest nie zmieniona ?

Trzecia publikacja cyklu, artykuł przeglądowy, to bardzo obszerny, szczegółowy i wartościowy przegląd literatury dotyczący wpływu bisfosfonianów (szczególnie zawierających azot) na komórki i mitochondria. Praca oparta jest na ponad 80 pozycjach literaturowych w tym wiele z ostatnich lat. Co więcej, artykuł zawiera wyniki dwóch ocenianych prac eksperymentalnych doktorantki, osadzając je w szerszym kontekście biologicznym i klinicznym. Przegląd rozpoczyna się od omówienia historii zastosowań, budowy i klasyfikacji bisfosfonianów oraz efektów ubocznych ich stosowania jako leków na osteoporozę. Następnie autorki przedstawiają szlak mewalonianowy i jego znaczenie biologiczne, a także opisują, jak jego hamowanie przez bisfosfoniany wpływa na funkcjonowanie komórek i mitochondriów. W dalszej części analizowane są negatywne skutki bisfosfonianów, w tym stres oksydacyjny, zaburzenia energetyczne i apoptoza, a całość kończy się refleksją nad potencjalnymi strategiami ochronnymi, takimi jak suplementacja koenzymem Q10.

Opisane powyżej trzy publikacje tworzą spójną narrację naukową, która nie tylko ujawnia mechanizmy działania bisfosfonianów w komórkach śródbłónka, ale sugeruje możliwość minimalizacji skutków ubocznych tych leków. Wszystkie publikacje prezentują wysoki poziom naukowy. Chciałabym również dodać, że wyniki badań przedstawione w pracy doktorskiej zostały uzyskane w ramach dwóch projektów typu OPUS finansowanych przez NCN i przyznanych promotorowi ocenianej rozprawy.

Podsumowując, rozprawa doktorska mgr Adrianny Budzińskiej pt. „Wpływ bisfosfonianów stosowanych w terapii osteoporozy na metabolizm tlenowy komórek śródbłónka” stanowi cykl rzetelnie wykonanych i wnikliwie zinterpretowanych badań, które wnoszą istotny, nowatorski wkład zarówno do biologii komórki jak i farmakologii bisfosfonianów. Rozprawa ta poszerza naszą wiedzę o potencjalnych skutkach ubocznych tej grupy leków na poziomie komórkowym, a szczególnie na poziomie mitochondriów. Rozprawa spełnia wszystkie wymagania określone w art.13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 z późniejszymi poprawkami wprowadzonymi Ustawą z dnia 18 marca 2011 r o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2016 r. poz.882).

W związku z powyższym wnoszę do Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza o dopuszczenie Pani mgr Adrianny Budzińskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Z uwagi na wysoki poziom merytoryczny rozprawy, solidność oraz znaczenie poznawcze i aplikacyjne uzyskanych wyników, a także ich publikację w prestiżowych czasopismach naukowych, rekomenduję wyróżnienie pracy stosowną nagrodą.