

dr hab. Marzena Wojciechowska, prof. ICHB PAN  
Zakład Chorób Rzadkich  
Instytut Chemii Bioorganicznej  
Polskiej Akademii Nauk  
Noskowskiego 12/14  
61-704 Pozna

Pozna , 03.01.2022

## RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Imię i nazwisko kandydata: mgr Katarzyna Bilińska

Tytuł rozprawy doktorskiej: Identyfikacja i znaczenie komórek podporowych w mechanizmie powstawania zaburzeń w węchu w chorobie COVID-19

Promotor: dr hab. Rafał Butowt, prof. UMK

Recenzent: dr hab. Marzena Wojciechowska, prof. ICHB PAN

Rozprawa doktorska mgr Katarzyny Bilińskiej została wykonana w Katedrze Anatomii Prawidłowej, Wydziału Lekarskiego Collegium Medicum w Bydgoszczy, pod kierunkiem dr hab. Rafała Butowta, prof. UMK, promotora rozprawy. Praca została przygotowana w formie spójnego tematycznie cyklu artykułów, składającego się z czterech prac do wiadczalnych i jednej przeglądowej, opublikowanych w latach 2020-2021. W trzech publikacjach Doktorantka jest pierwszym autorem. Wyniki badań składające się na ten cykl dotyczą aktualnej sytuacji o zasięgu globalnym, wywołanej pojawieniem się w 2019 r. wirusa SARS-CoV-2, odpowiedzialnego za chorobę COVID-19. Jest to schorzenie wielonarządowe, któremu towarzyszy m.in., wiele obwodowych i ośrodkowych objawów neurologicznych. Jednymi z najczęściej spotykanych i najbardziej charakterystycznych tego rodzaju symptomów są zaburzenia zmysłów chemosensorycznych, takich jak węch i smak.

Podstawowym celem pracy było poznanie biologicznego mechanizmu prowadzącego do powstania zaburzeń w węchu, obserwowanych u wielu pacjentów chorujących na COVID-19. W

szczególnie ci, Doktorantka podjęła badania zmierzające do określenia potencjału wirusa SARS-CoV-2 do wejścia drogą wchłonięcia do mózgu, oraz badania zmierzające do identyfikacji genetycznych czynników koronawirusa SARS-CoV-2 wpływających na czynniki występowania zaburzeń wchłonięcia u pacjentów z COVID-19. Prace badawcze układu wchłoniętego przeprowadzono z wykorzystaniem modelu myszy laboratoryjnej, z uwagi na fakt, iż na poziomie anatomicznym i molekularnym układ wchłonięty myszy jest zbliżony do układu ludzkiego. Wyniki zawarte w dysertacji stanowią oryginalny wkład naukowy i są bardzo cennym dodatkiem w procesie wyjaśnienia mechanizmów zakażenia SARS-CoV-2 i ich konsekwencji w postaci zaburzeń zmysłów chemosensorycznych, takich jak węch i smak. Wobec tego, cele jakie wytoczyła sobie Doktorantka wydają się bardzo zasadne i w mojej opinii rozprawa zasługuje na wysoką ocenę pod względem merytorycznym.

Niniejsza praca doktorska, która jest odpowiedzią na potrzebę lepszego zrozumienia komórkowego i molekularnego mechanizmu zaburzeń wchłonięcia u pacjentów z COVID-19 zawiera istotne wyniki, z których na szczególne podkreślenie zasługuje zaproponowanie przybliżonego komórkowego mechanizmu prowadzącego do zaburzeń odczuwania bodźców zapachowych. W szczególności są to: (i) Ustalenie, iż poziom ekspresji ACE2 (receptora dla wirusa SARS-CoV-2), który jest wysoki w nabłonku wchłoniętym w jamie nosowej, znacznie niższy w wchłoniętych ośrodkach w mózgu, jest odpowiedzialny za inicjację zaburzeń wchłonięcia po infekcji wirusem w miejscu wyszej ekspresji ACE2 tj. w nabłonku wchłoniętym; (ii) Ustalenie, iż w nabłonku wchłoniętym wirus infekuje głównie komórki ACE2-pozytywne, powodując upośledzenie ich funkcji osłonowych w stosunku do neuronów wchłoniętych, co prawdopodobnie skutkuje nagłym zakłóceniem odbioru bodźców zapachowych przez receptorowe neurony wchłonięte; (iii) Ustalenie, iż zlokalizowane wzdłuż drogi wchłoniętej neurony czaszkowego nerwu kłobowego wykazują, w przeciwieństwie do neuronów wchłoniętych, wyraźną ekspresję ACE2 oraz innych białek ułatwiających wejście wirusa SARS-CoV-2 do komórki gospodarza. Dlatego te, neurony kłobowe mogą być potencjalnie drogą dla wejścia wirusa SARS-CoV-2 do mózgu; (iv) Ustalenie, iż mutacja D614G w białku kolca S, która pojawiła się wiosną 2020 roku i zdominowała populację wirusa na całym świecie, przyczyniła się do wzrostu czynnika występowania zaburzeń wchłonięcia w czasie pandemii COVID-19; oraz (v) Na podstawie uzyskanych wyników zaproponowano, iż w związku z ograniczonym

neurotropizmem wirusa SARS-CoV2, istnieje niewielkie prawdopodobieństwo masowej infekcji mózgu u pacjentów z COVID-19.

Praca została poprawnie skonstruowana i uwzględnia wszystkie wymagane elementy rozprawy doktorskiej przygotowanej w formie zbioru artykułów. Na 121 stronach Autorka zawarła streszczenia w języku polskim i angielskim, opis artykułów stanowiących podstawę ocenianej rozprawy doktorskiej i ich interpretację na tle piśmiennictwa przedmiotu, jak również jasno sformułowane cele badawcze pracy. Do rozprawy dołączono piśmiennictwo opublikowanych artykułów naukowych oraz oświadczenia współautorów o indywidualnym procentowym wkładzie w każdą publikację. W rozdziale „Wnioski i Podsumowanie” Doktorantka umiejętnie dyskutuje uzyskane wyniki oraz podkreśla ich wartość, wskazując na wkład w najnowsze badania zmierzające do wyjaśnienia złożonego problemu COVID-19. Wnioski, jakie formułuje Doktorantka zostały przedstawione na tle bogato cytowanego piśmiennictwa zamieszczonego w rozdziale przy końcu rozprawy i obejmującego ponad 100 pozycji. Ponadto, Autorka umieściła w rozprawie „Wykaz skrótów i referat internetowych”, co zdecydowanie ułatwia czytanie rozprawy. Publikacje składające się na cykl, są bardzo dobrze i starannie przygotowane, zawierają przejrzyste, właściwie dobrane do prezentowania określonego typu wyników dokumentacje graficzne. Co istotne, zgodnie z oświadczeniami współautorów, Doktorantka miała bardzo duży (od 65 do 80%) udział w tworzeniu tych publikacji. We wszystkich pracach recenzowanego cyklu mgr Katarzyna Bilińska zarówno projektowała je i wykonywała oświadczenia, analizowała wyniki i opracowywała manuskrypty, co świadczy o bardzo dużym zaangażowaniu i samodzielności Doktorantki. Autorem korespondencyjnym wszystkich prac cyklu jest promotor dr hab. Rafał Butowt, prof. UMK.

W mojej opinii rozprawa zasługuje na wysoką ocenę pod względem merytorycznym. Doktorantka umiejętnie wprowadziła czytelnika w tematyczne badania we wstępie do rozdziału dysertacji zatytułowanego „Streszczenie prac i ich interpretacja na tle piśmiennictwa przedmiotu”, a wszystkie potrzebne informacje zawarła w obszernym, przejrzystym opisie publikacji składających się na cykl artykułów. Techniki badawcze

zostały opisane obszernie w czterech opublikowanych artykułach do wiadczalnych. Na ich podstawie można stwierdzić, że Kandydatka wykorzystwała różnorodny i nowoczesny warsztat badawczy, w tym sekwencjonowanie nowej generacji (RNA-Seq), metody immunocytochemiczne, techniki Western blot i hybrydyzację *in situ*. Ponadto, umiejętnie posługuje się narzędziami bioinformatycznymi i statystycznymi do analizy uzyskanych danych. Sposób przedstawienia wyników i krytyczna ich analiza podlegały już ocenie przez recenzentów czasopism, w których zostały opublikowane artykuły będące podstawą rozprawy. Tym niemniej, na podstawie rozdziału dysertacji zatytułowanego „Wnioski i Podsumowanie” należy stwierdzić, że Doktorantka potrafi krytycznie analizować i umiejętnie interpretować swoje wyniki, dyskutować je na tle bogato cytowanego piśmiennictwa oraz poprawnie formułować wnioski.

Wszystkie publikacje stanowiące podstawę ocenianej rozprawy doktorskiej zostały opublikowane w czasopismach o międzynarodowym zasięgu z listy JCR o znaczących współczynnikach wpływu (IF) oraz dużej liczbie punktów MNiSW. Sumaryczna wartość współczynnika IF dla tych prac wyniosła ponad 23 (średni IF=4.635). Trzy prace do wiadczalne ukazały się roku 2020 w ACS Chemical Neuroscience (IF= 4.418, 100 pkt MNiSW), za rok później została opublikowana praca w Frontiers in Cellular Neuroscience (IF= 5.505, 100 pkt MNiSW). Praca przeglądowa opublikowana została w 2020 roku w czasopiśmie ACS Chemical Neuroscience (IF= 4.418, 100 pkt MNiSW). W dwóch pierwszych publikacjach (Bilińska i in., 2020; Butowt i Bilińska, 2020) opisano, jak doszło do identyfikacji komórek podporowych jako kluczowego elementu w procesie powstawania zaburzeń w mózgu u pacjentów z COVID-19. Odkrycie to oparte zostało, zarówno o dane *in silico*, jak i dane eksperymentalne dotyczące ekspresji białka ACE2, które jest obligatoryjnym receptorem dla wirusa SARS-CoV-2. W następnej pracy (Bilińska i in., 2021), Doktorantka przedstawiła potencjalną drogę przedostania się wirusa SARS-CoV-2 do mózgu wzdłuż czaszkowego nerwu kochowego. Autorka uzasadnia, że na tak blisko wskazuje ekspresja białka ACE2 i innych białek, istotnych dla infekcji, w wielu analizowanych komórkach tego nerwu. Kolejna praca (Butowt i in., 2020), zwraca uwagę na wpływ genetycznej zmienności wirusa SARS-CoV-2, a zwłaszcza mutacji w białku kolca S, na czynniki występowania zaburzeń w mózgu w COVID-19. W tej pracy została postawiona hipoteza, że wariant wirusa SARS-CoV-2 z mutacją D614G jest wariantem

wirusowym czynnikiem genetycznym, który zwiększa zarówno infekcyjność wirusa jak i wierność z podwyższonym ryzykiem wystąpienia u chorych anosmii i hiposmii. Ostatecznie, w artykule przeglądowym (Bilińska i Butowt, 2020), Doktorantka podsumowała wiedzę hipotezy dotyczącej etiologii zaburzeń wchu w COVID-19 w świetle aktualnej wiedzy. Wszystkie wyżej wymienione artykuły, stanowiące podstawę ocenianej rozprawy doktorskiej są wartościowymi i oryginalnymi opracowaniami, tworzą dobrze zaprojektowany i prawidłowo przeprowadzony cykl badań. O jakości prac świadczy ich wysoki indeks cytowania. Na szczególną uwagę zasługują dwie prace dołączalne z roku 2020 (Bilińska i in., 2020; Butowt i Bilińska, 2020), z których każda zdobyła już ponad 150 cytowań.

W pracy nie znalazłam elementów, które budziłyby jakiegokolwiek merytoryczne wątpliwości, a kilka pytań wymienionych poniżej traktuję jako akademicką dyskusję, nie wpływając na wartość naukową przedstawionej rozprawy, której całość oceniam pozytywnie i bardzo wysoko.

1) We Wstępie, str.21, Doktorantka napisała: *„Niestety zbyt mała wiedza o patogenezie tej choroby oraz biologii nowego wirusa uniemożliwiła jak dotąd opracowanie skutecznej strategii profilaktycznej i terapeutycznej”*. Czy w obliczu najnowszych wyników badań, które pojawiają się każdego dnia w PubMedie, Doktorantka odnotowała w ostatnim czasie sygnały wskazujące na postęp w kwestii opracowania skutecznej strategii profilaktycznej i terapeutycznej w COVID-19?

2) Wstępie, str.21, Doktorantka napisała: *„Szczególnie niepokojącym faktem jest, że chociaż dominującym objawem klinicznym COVID-19 jest ciężkie upośledzenie układu oddechowego, w wielu przypadkach rozpoznaje się również u chorych różnorodne objawy neurologiczne włączając zapalenie mózgu, zaburzenia świadomości, zaburzenia kognitywne, w tym pamięci (Alonso-Lana i in., 2020)”*. Czy wiadomo, jakie czynniki molekularne są odpowiedzialne za występowanie objawów neurologicznych u pacjentów z COVID-19?

3) Wstępie, str.21, Doktorantka napisała: *„Obwodowe objawy neurologiczne takie jak dysosmia (zaburzenie wchu) i dysgeuzja (zaburzenie smaku) są powszechne i mogą występować nawet przy braku innych objawów klinicznych COVID-19 (Butowt i von Bartheld, 2020). Do tego u*

*cz ci ozdrowie ców dysosmia i dysgeuzja nie zanikaj lecz wyst puj w sposób chroniczny (Burges Watson i in., 2021)". Co według Doktorantki odpowiada za chroniczno zaburze w chu i smaku u cz ci ozdrowie ców?*

4) Wst p, str.22, Doktorantka napisała: *„Innym wa nym aspektem jest mo liwe zagro enie osób z przedłu aj cymi si zaburzeniami w chu rozwojem, w przyszło ci, chorób neurodegeneracyjnych (Xydakis i in., 2021)".* Czy wobec powy szego stwierdzenia, nale y uzna e osoby obci one chorobami neurodegeneracyjnymi s szczególnie zagro one w przypadku zaka enia wirusem SARS-CoV-2?

#### OCENA KO COWA

Przedstawion mi do recenzji rozpraw doktorsk mgr Katarzyny Bili skiej oceniam bardzo wysoko. Rozprawa ta zawiera szereg interesuj cych i nowych dla nauki obserwacji. Wszystkie one zostały rzeczowo przedyskutowane w oparciu o bardzo dobr znajomo danych literaturowych. Rozprawa wskazuje na du e odczytanie Doktorantki w temacie, umiej tno interpretacji skomplikowanych wyników, które nosz znamiona odkry naukowych. Po zapoznaniu si z tre ci rozprawy jestem przekonana o dobrym przygotowaniu Doktorantki do dalszej samodzielnej pracy badawczej, obejmuj cej planowanie i prowadzenie eksperymentów, a tak e wnikliw i prawidłow interpretacj uzyskanych wyników. Cele badawcze rozprawy doktorskiej i uzyskane wyniki podkre laj wag problemu jakim zaj ła si Doktorantka, oraz uzasadniaj konieczno kontynuacji bada w celu wyja nienia etiologii i patogenezы zaburze chemosensorycznych w COVID-19.

Podsumowuj c, stwierdzam, e przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska mgr Katarzyny Bili skiej spełnia warunki okre lone w art. 13, ust. 1, Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. z 2017 r., poz. 1789 z pó n. zmianami). Na tej podstawie, składam wniosek do Rady Wydziału Nauk Biologicznych Uniwersytetu Zielonogórskiego w Zielonej Górze o dopuszczenie mgr Katarzyny Bili skiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocze nie, bior c pod uwag du aktywno naukow Doktoratki w szczególnie trudnym okresie przypadaj cym

na pojawienie się i rozkwit pandemii, jak również ilości i poziom naukowy załączonych publikacji, wnioskuje o wyrażenie opinii przedstawionej mi do recenzji rozprawy doktorskiej.

dr hab. Marzena Wojciechowska, prof. ICHB PAN



