

## **Recenzja rozprawy doktorskiej**

**Pana mgr Piotra Wojtyniaka**

### **„Rola mitofuzyny 2 w uszkodzeniu i regeneracji komórek w modelach ischemii i reperfuzji mózgu”**

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska Pana mgr Piotra Wojtyniaka została napisana w oparciu o wyniki badań przeprowadzonych w Instytucie Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. Mirosława Mossakowskiego PAN w Warszawie. Promotorem pracy jest Pani Prof. dr hab. n. med. Barbara Zabłocka, a promotorem pomocniczym Pani dr Maria Kawalec.

Doktorant podjął próbę szczegółowej analizy procesów dynamiki, usuwania i biogenezy mitochondriów w modelach *in vivo* i *in vitro*, z oceną zależności między tymi procesami w modelu przejściowego niedokrwienia mózgu. Ponadto wskazał na znaczącą rolę białka mitofuzyny 2 w regulacji procesów warunkujących funkcjonowanie mitochondriów, w kontekście przeżycia neuronów, w odpowiedzi na przejściowy bodziec niedokrwienno-energetyczny oraz przejściowy niedobór tlenu i glukozy. Przeprowadzone szczegółowe badania, z oceną morfologii i funkcji mitochondriów w neuronach poddanych kolejnym etapom badań doświadczalnych, oraz uzyskane wyniki pozwoliły na sformułowanie wniosków potwierdzających wstępne hipotezy.

#### **Układ rozprawy doktorskiej**

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska Pana mgr Piotra Wojtyniaka przedstawiona została w formie liczącego 98 stron opracowania, będącego omówieniem powiązanych tematycznie dwóch artykułów naukowych:

1. Maria Kawalec, **Piotr Wojtyniak**, Ewelina Bielska, Anita Lewczuk, Anna Boratyńska-Jasińska, Małgorzata Beręsewicz-Haller, Małgorzata Frontczak-Baniewicz, Magdalena Gewartowska, Barbara Zabłocka. Mitochondrial dynamics, elimination and biogenesis during post-ischemic recovery in ischemia-resistant and ischemia-vulnerable gerbil hippocampal regions. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 2023 Mar;1869(3):166633. doi: 10.1016/j.bbadis.2022.166633. Epub 2022 Dec 22.

2. **Piotr Wojtyniak**, Anna Boratynska-Jasinska, Karolina Serwach, Joanna Gruszczynska-Biegala, Barbara Zablocka, Jacek Jaworski, and Maria Kawalec. Mitofusin 2 Integrates Mitochondrial Network Remodelling, Mitophagy and Renewal of Respiratory Chain Proteins in Neurons after Oxygen and Glucose Deprivation. *Mol Neurobiol.* 2022; 59(10): 6502–6518. Published online 2022 Aug 13. doi: 10.1007/s12035-022-02981-6

Oba zostały opublikowane w 2022r. Badania będące przedmiotem publikacji były przeprowadzone w ramach projektów naukowo-badawczych finansowanych przez Narodowe Centrum Nauki i Europejski Fundusz Społeczny. Doktorant jest współautorem pierwszej i pierwszym autorem drugiej publikacji. Obie publikacje ukazały się w renomowanych czasopismach z listy filadelfijskiej, z wysokimi współczynnikami impact factor, odpowiednio 6,633 i 5,686.

**SPIS TREŚCI** jest przedstawiony w formie przejrzystej. **WYKAZ SKRÓTÓW** zawiera polskie tłumaczenia, lub opisy (np. parkina – ligaza ubikwityny E3), z pominięciem określeń angielskich, będących podstawą stosowanych skrótów. Niezależnie od założenia, że czytelnik zna lub domyśla się właściwego tłumaczenia, wydaje się, że standardowy sposób przedstawiania stosowanych w tekście skrótów byłby bardziej przejrzysty.

Tekst główny rozprawy jest poprzedzony **STRESZCZENIEM** w języku polskim i angielskim, zawierającym krótkie uzasadnienie wybranego tematu pracy, przedstawienie w syntetycznej formie całości zagadnienia, z podkreśleniem wytyczonych celów, punktowym zarysowaniem kolejnych etapów badań. Zawiera również podsumowanie uzyskanych wyników, oraz sformułowanie podstawowych wniosków.

W rozdziale **INNOWACYJNOŚĆ ROZPRAWY** doktorant sugeruje, że podjęta tematyka badań ukierunkowana na ocenę dynamiki i zależności procesów dotyczących funkcji mitochondriów, również z uwzględnieniem znaczenia mitofuzyny 2, jest oryginalną i nowatorską. Wykazane w pracy zależności, zostały przedstawione w postaci trzech wniosków: 1. uszkodzenie mitochondriów poprzedza zmiany morfologiczne oraz śmierć neuronów w następstwie bodźca ischemicznego; 2. zwiększona dynamika sieci mitochondrialnej, aktywacja mitofagii i biogenezy po krótkotrwałym niedokrwieniu i reperfuzji mózgu *iv vivo* jest wyraźniej widoczna w sektorze CA2-3 DG niż CA1 hipokampa, co może sugerować różną podatność na bodziec niedokrwienno-reperfuzyjny; 3. eksperymentalne obniżenie ekspresji Mfn2 w neuronach nasila autofagię, hamuje biogenezę mitochondriów i prowadzi do zwiększonego uszkodzenia neuronów w odpowiedzi na przejściowy brak tlenu i glukozy w modelu *in vitro*.

Zasadnicza część pracy obejmuje następujące rozdziały: **WSTĘP**, **CEL PRACY**, **MATERIAŁY I METODY**, **PODSUMOWANIE NAJWAŻNIEJSZYCH WYNIKÓW**, **DYSKUSJA**, **PODSUMOWANIE**, **LITERATURA**, **WSKAŹNIK ODDZIAŁYWANIA**, **KOPIE PUBLIKACJI**, **OŚWIADCZENIA WSPÓŁAUTORÓW**. Omówienie kolejnych rozdziałów:

**WSTĘP** – Rozpoczyna się krótkim omówieniem problematyki klinicznej dotyczącej udaru mózgu i przejściowych zaburzeń krążenia mózgowego w aspekcie epidemiologii,

podstawowych czynników ryzyka oraz ograniczeń możliwości skutecznego leczenia. W tym miejscu Doktorant powołuje się na publikacje z 2010r i 2018r, podczas gdy są dostępne, i były cytowane w odpowiednim akapicie wstępu publikacji 1, dane z 2022r. W kontekście leczenia chorych z udarem mózgu aktualne dane mają wyjątkowe znaczenie. Kolejno Autor omawia różną podatność na uszkodzenia komórek poszczególnych sektorów hipokampa, jako jednej z najbardziej wrażliwej na niedokrwienie struktury mózgu. Bardzo szczegółowo została omówiona rola mitochondriów w zachowaniu homeostazy energetycznej komórki, z podkreśleniem ich właściwości umożliwiających zmianę kształtu, wielkości, położenia poprzez regulowane procesy podziału i fuzji. Podkreślono znaczenie szeregu wyspecjalizowanych białek, przede wszystkim mitofuzyny 1 i 2, Opa1 odpowiadających za fuzję błon mitochondrialnych, stanowiących o integralności mitochondriów. Autor powołuje się na publikacje również z 1994r, co świadczy o zainteresowaniu naukowców tym problemem od wielu lat. Istotne znaczenie dla prawidłowego funkcjonowania komórki ma zjawisko mitofagii (autofagii mitochondriów); Autor omawia liczne zależności między ROS, MPTP, PTEN-PINK1, parkiną, mitochondrialnym potencjałem błonowym i ponownie mitofuzyną 2. Następstwem mitofagii jest proces biogenezy mitochondriów, którego głównym regulatorem jest koaktywator receptorów aktywowanych proliferatorami peroksysonów 1 alfa (PGC-1alfa) tworzący kompleksy z DNA i innymi czynnikami transkrypcyjnymi. Autor omawia następnie oba typy mitofuzyny 1 i 2, z podkreśleniem znacznego stopnia ich homologii, jak również z zaznaczeniem innych funkcji przypisywanych mitofuzynie2, takich jak pośrednictwo w tworzeniu i regulacji połączeń mitochondriów z siateczką śródplazmatyczną, oraz wpływ na proces biogenezy mitochondriów. Omówienie powyższych funkcji mitochondriów zostało poparte licznymi odnośnikami do licznych publikacji, w tym również z 1994r, co świadczy o znaczeniu i zainteresowaniu tematem w przeszłości. W podsumowaniu wstępu przedstawiono uzasadnienie planowanych badań, które miałyby zweryfikować hipotezę, że Mfn2 w neuronach może działać jako białko integrujące przebudowę sieci mitochondrialnej z mitofagią i biogenezą mitochondriów; przedstawiono założenie, że zależności między dynamiką, eliminacją i biogenezą mitochondriów mogą być kluczowe dla zachowania homeostazy mitochondriów, a tym samym przeżycia neuronów w warunkach stresu niedokrwienno-reperfuzyjnego. Wydaje się, że biorąc pod uwagę szeroką bibliografię dotyczącą tematu, założone hipotezy nie wymagają weryfikacji, natomiast niezwykle cenne jest każde uzupełnianie już poznanych procesów.

**CEL PRACY** – w rozdziale Doktorant sformułował zasadniczy cel pracy, którym było poznanie roli Mfn2 w odpowiedzi neuronów na bodziec ischemiczno-reperfuzyjny ze szczególnym uwzględnieniem procesów odpowiadających za dynamikę sieci, zawartość i jakość mitochondriów. Określone zostały również dwa cele szczegółowe:

1. porównanie dynamiki fuzji i podziału, eliminacji oraz biogenezy mitochondriów w odpowiedzi na przejściowe niedokrwienie mózgu w sektorach hipokampa suwaka mongolskiego (*Meriones unguiculatus*), charakteryzujących się różną przeżywalnością

neuronów po bodźcu ischemiczno-reperfuzyjnym (wyniki zostały przedstawione w publikacji 1);

2. zbadanie roli Mfn2 w przebudowie sieci mitochondrialnej, eliminacji i biogenezie mitochondriów w neuronach *in vitro* w odpowiedzi na przejściowy brak tlenu i glukozy (OGD) poprzez ocenę przebiegu tych procesów w neuronach prawidłowych oraz z obniżoną ekspresją Mfn2 (wyniki zostały przedstawione w publikacji 2).

**MATERIAŁ I METODY** – Autor omówił zastosowane w badaniach, dwa dobrze scharakteryzowane modele stresu niedokrwienno-reperfuzyjnego.

Pierwszym był model *in vivo*, polegający na przejściowym 5 minutowym globalnym niedokrwieniu mózgu suwaka mongolskiego. Wpływ niedokrwienia na przeżycie neuronów w badanych CA1 i CA2-3 DG, sektorach hipokampa, określano na podstawie oceny zmian dynamiki sieci mitochondrialnej w obecności białek i innych czynników związanych z poszczególnymi elementami tych procesów: fuzją (Mfn1, Mfn2, Opa1), podziałem mitochondriów (Drp1 oraz jego forma ufosforylowana na Ser616), ogólną i specyficzną autofagią (LC3, SQSTM1/p62, PINK1 i parkina), biogenezą (czynniki transkrypcyjne PGC-1 $\alpha$ , Nrf1, Tfam oraz białka podjednostek kompleksów łańcucha oddechowego); ponadto oznaczano pośrednio zawartość mitochondriów w oparciu o aktywność syntazy cytrynianowej, poziomu białka macierzy mitochondrialnej Hsp60 oraz pomiar stosunku DNA mitochondrialnego do jądrowego (mtDNA/nDNA). W mikroskopie elektronowym przeprowadzono szczegółową ocenę ultrastruktury i morfologii mitochondriów za pomocą programu ImageJ, według zasad opisanych, wg autora, w cytowanych publikacjach Dagda i wsp 2009 oraz Lam i wsp. 2021. Wydaje się, że pierwsza z cytowanych prac nie dotyczy protokołów stosowanych w mikroskopii elektronowej, niezależnie od kilku zdjęć z ME zamieszczonych w tekście, a raczej wpływu utraty funkcji PINK1 na przemiany mitochondriów.

W drugim modelu *in vitro*, wykorzystano hodowlę pierwotną neuronów kory mózgu szczura do oceny różnych aspektów przeżycia neuronów poddanych przejściowemu, 1-godzinemu niedoborowi tlenu i glukozy. Ocena, przeprowadzona po 3 i 24 godzinach po przywróceniu tlenu i glukozy, dotyczyła neuronów prawidłowych i z obniżoną ekspresją Mfn2. Do oceny śmiertelności neuronów wykorzystano pomiary uwalniania dehydrogenazy mleczanowej (LDH) do pożywki hodowlanej. Analizowano dynamikę mitochondriów w oparciu o ocenę białek związanych z fuzją (Mfn1, Mfn2, Opa1) oraz podziałem mitochondriów (Drp1). Do oceny mitofagii służyło białko markerowe parkina oraz poziom białek TOM22 i Hsp60. Postęp mitofagii analizowano z użyciem sondy immunofluorescencyjnej. Ponadto oceniano akumulację parkiny na mitochondriach, jako głównego wskaźnika uszkodzenia i podstawowego etapu selektywnej eliminacji mitochondriów. Biogenezę oceniano podobnie jak w modelu *in vivo*.

Oba modele doświadczalne zostały szczegółowo opisane w publikacjach będących przedmiotem rozprawy doktorskiej.

**PODSUMOWANIE NAJWAŻNIEJSZYCH WYNIKÓW** – w rozdziale zostały przedstawione wyniki przeprowadzonych badań, odnoszące się do zaplanowanych celów szczegółowych i będące punktem wyjścia do sformułowania wniosków końcowych.

W podrozdziale dotyczącym **celu szczegółowego 1**, Autor podkreślił różnice reakcji komórek hipokampa pochodzących z różnych fragmentów hipokampa CA1 i CA2-3 DG. W bardziej podatnych na uszkodzenie w przebiegu stresu niedokrwiennie-reperfuzyjnego neuronach sektora CA1, obserwowano zaawansowane morfologiczne wykładniki uszkodzenia mitochondriów. Cechy nasilonego podziału mitochondriów znalazły odbicie w ponad dwukrotnym wzroście, w porównaniu do kontroli, stosunku p-Drp1/Drp1 przy równoczesnym postępującym w czasie obniżeniu poziomu białek odpowiedzialnych za fuzję mitochondriów, Mfn1, Mfn2 i Opa1. Zaobserwowano również cechy aktywnego usuwania uszkodzonych organelli, widoczne w mikroskopie elektronowym oraz w zakresie poziomów białek związanych z nieselektywną autofagią. W neuronach sektora CA2-3 DG objawy uszkodzeniowe we wspomnianych aspektach były mniej nasilone, z wyraźniej zaznaczonymi elementami aktywnych procesów kompensujących uszkodzenie. Autor podkreśla znaczenie wzrostu ilości Mfn2 wraz z aktywacją pozostałych białek związanych dynamiką sieci mitochondrialnej, kontrolowaną mitofagią oraz biogenezą mitochondriów w sektorach CA2-2, DG hipokampa odpornych na stres krótkotrwałego niedokrwienia i reperfuzji w przebiegu zjawiska endogennej neuroprotekcji. Szczegółowe omówienie wyników zostało przedstawione w publikacji 1.

W podrozdziale dotyczącym **celu szczegółowego 2**, Autor opisał wpływ krótkotrwałego braku tlenu i glukozy na prawidłowe oraz pozbawione Mfn2 neurony w hodowli *in vitro*. Zastosowany bodziec powodował znaczący i długotrwały spadek zawartości Mfn2 w neuronach prawidłowych, z jednoczesnym wczesnym i przejściowym wzrostem mitofagosomów oraz cechami selektywnej aktywacji procesów eliminacji uszkodzonych mitochondriów. Stwierdzono również cechy kompensacyjnej biogenezy mitochondriów. Natomiast w neuronach z obniżoną ekspresją Mfn2 występowały cechy zaburzenia równowagi fuzji i podziałów mitochondriów z fragmentacją sieci mitochondrialnej. Ciekawym spostrzeżeniem jest uwaga, że obniżeniu ekspresji Mfn2 towarzyszyła zwiększona akumulacja parkiny na mitochondriach wraz ze zmniejszonym poziomem tego białka co, według Autora, sugeruje łagodne uszkodzenie mitochondriów w tych neuronach, długo przed zadziałaniem bodźca OGD. Zauważono również, że obniżonej ekspresji Mfn2 towarzyszyło zwiększenie ekspresji Mfn1, jednak bez skutecznej kompensacji. Wydaje się, że warto byłoby rozszerzyć dyskusję dotyczącą zauważonej korelacji. Podkreślono, że obniżenie Mfn2 ograniczało możliwość regeneracji i ograniczoną odbudowę zdolności oddechowej mitochondriów po OGD.

Oba podrozdziały są zakończone syntetycznym podsumowaniem wyników.

## DYSKUSJA

W dyskusji Doktorant wielokrotnie wskazuje, że proces warunkujący reakcję i przeżycie neuronów na stres reperfuzyjno-niedokrwienny jest procesem złożonym, zależnym od wielu relacji między organellami komórkowymi, w tym mechanizmów dynamiki sieci mitochondrialnej, eliminacji i biogenezy mitochondriów. Autor wskazuje, powołując się na liczne artykuły, że uzyskane w czasie prowadzonych badań wyniki pokrywają się z wcześniej publikowanymi w podobnych modelach, zarówno w zakresie zmian morfologicznych jak i poziomów białek, w tym Mfn2, związanych z procesami uszkodzenia i naprawy mitochondriów. Dlatego w tym aspekcie bardziej uzasadnione wydaje się sformułowanie, że uzyskane wyniki potwierdziły wcześniej prezentowane. Jednocześnie Autor przyznaje, że osiągnięte wyniki nie pozwalają na jednoznaczne opisanie mechanizmów warunkujących przeżycie neuronów. Powołując się na liczne dane z piśmiennictwa, podkreśla złożoność tych procesów, wskazując na konieczność prowadzenia kolejnych badań w tym zakresie. Podsumowanie dyskusji wskazuje, że uzyskane wyniki wpisują się w aktualny stan wiedzy na temat wzajemnych zależności między dynamiką, eliminacją i biogenezą mitochondriów; potwierdzają istotną rolę mitofuzyny 2, jako białka koniecznego dla prawidłowego przebiegu procesów odpowiedzialnych za fuzję mitochondriów, tworzenie połączeń z siateczką śródplazmatyczną, a także integracji przebudowy sieci mitochondrialnej z mitofagią i biogenezą mitochondriów.

W **PODSUMOWANIU** Doktorant zawarł pięć ogólnych wniosków pośrednich:

1. w neuronach przeżywających przejściowe niedokrwienie dochodzi do wzrostu dynamiki mitochondriów objawiającej się wzmożoną fuzją;
2. selektywna i kontrolowana autofagia, w tym szczególnie mitofagia, zależna od PINK1 i parkiny, sprzyja przeżyciu neuronów po bodźcu ischemiczno-reperfuzyjnym *in vivo* i krótkotrwałym OGD *in vitro*;
3. równowaga między procesami eliminacji i biogenezy mitochondriów jest kluczowa dla przeżycia neuronów po łagodnym/przejściowym bodźcu I/R i OGD;
4. Mfn2 bierze szczególny udział w kształtowaniu i utrzymaniu prawidłowej sieci mitochondrialnej w neuronach oraz jej przebudowie po bodźcu I/R i OGD;
5. Mfn2 moduluje stopień eliminacji wadliwych mitochondriów i pozytywnie wpływa na ich regenerację poprzez wzmożoną fuzję i odbudowę w procesach biogenezy;

przy czym 4 i 5 wydają się być powtórzeniem i mogłyby być połączone.

**WNIOSEK** - Wyniki przeprowadzonych badań pozwoliły na sformułowanie wniosku, odpowiadającego postawionemu zasadniczemu celowi pracy, że Mfn2 jest białkiem koniecznym do prawidłowej odpowiedzi neuronów na przejściowy bodziec niedokrwienny, umożliwiając ich przeżycie, poprzez regulowanie zależności pomiędzy eliminacją mitochondriów a ich biogenezą.

**LITERATURA** – opracowanie jest uzupełnione o listę 110 pozycji aktualnej literatury przedmiotu, obejmującą prace publikowane w czasopiśmie z listy filadelfijskiej. Ma przejrzysty układ, w kolejności cytowań w tekście. Zwraca uwagę znacząca liczba publikacji, niekiedy będących odnośnikami do kolejnych wyrazów w jednym zdaniu opracowania. Warto również zauważyć, że w większości różnią się one od cytowanych w artykułach będących przedmiotem rozprawy doktorskiej. Z pewnością świadczy to o wyjątkowej skrupulatności Doktoranta w analizie literatury przedmiotu, ale czy rzeczywiście jest uzasadnione w takim stopniu? Bogata literatura wskazuje również na znaczenie tematu oraz prowadzone szeroko w przeszłości badania w tym zakresie.

**WSKAŹNIK ODDZIAŁYWANIA** – podano IF dla obu publikacji: pierwsza IF=6,633; druga IF=5,686

**KOPIE PUBLIKACJI** – w rozdziale dołączono kopie dwóch publikacji będących przedmiotem recenzowanej pracy doktorskiej. Publikacje składające się na przedstawiony cykl, są bardzo starannie przygotowane, zawierają przejrzystą, właściwie dobraną dokumentację graficzną, w tym dokumentację fotograficzną, szereg schematów, wykresów, tabel znacząco podnoszących wartość przedstawionych prac. Cały materiał graficzny został wyczerpująco opisany, a poszczególne wyniki zostały dokładnie przeanalizowane statystycznie.

**OŚWIADCZENIA** – w rozdziale umieszczono oświadczenia współautorów publikowanych prac ze szczegółowym określeniem zakresu wkładu indywidualnego w ich powstanie. W obu publikacjach, składających się na cykl będący podstawą rozprawy, Doktorant, zgodnie z zamieszczonymi oświadczeniami, miał znaczący udział w ich powstawaniu, na każdym etapie badań doświadczalnych. Wskazuje to na bardzo dużą wiedzę Doktoranta i zainteresowanie tematem, świadczy o zaangażowaniu i samodzielności Autora oraz umiejętności współpracy w zespole.

## **OMÓWIENIE / PODSUMOWANIE**

Układ rozprawy doktorskiej Pana mgr Piotra Wojtyniaka jest zgodny z normami przyjętymi dla tego typu opracowań, a na podkreślenie zasługuje bardzo duża syntetyczność, systematyczność wynikające z właściwie przyjętej koncepcji przygotowania rozprawy. Przejrzysty sposób ujęcia wyników przeprowadzonych badań eksperymentalnych wskazuje na zasadność i konsekwencję w zaplanowaniu i realizacji kolejnych etapów prac badawczych. Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska jest kompleksowym opracowaniem, którego głównym osiągnięciem jest bardzo dokładna analiza, potwierdzenie i uaktualnienie wcześniejszych danych przyczyniających się coraz lepszemu poznaniu mechanizmów warunkujących przeżycie komórek nerwowych poddanych różnego rodzaju uszkodzeniom. Można mieć nadzieję na wykorzystanie uzyskanych danych w praktyce klinicznej w przyszłości. Uzyskane wyniki pozwoliły na sformułowanie odpowiadających celom wniosków. Wysoka jakość opublikowanych prac będących podstawą rozprawy doktorskiej wskazuje, że Doktorant

doskonale opanował techniki mikrobiologiczne, biochemiczne, molekularne i inne, których zastosowanie pozwoliło na wyczerpującą realizację założonych celów.

Recenzowana praca napisana została w sposób wskazujący na dużą wiedzę teoretyczną i praktyczną, dążenie do rozwiązywania problemów, umiejętność interpretacji wyników, ich syntetycznego przedstawienia.. Doktorant wykazuje również rozsądny dystans do uzyskanych pozytywnych wyników przeprowadzonych badań. Postawione cele i hipotezy badawcze były konsekwentnie realizowane w podjętych eksperymentach badawczych. Dobór literatury jest odpowiedni, powiązany z tematyką pracy i świadczy o bardzo dobrej orientacji Doktoranta w badanej tematyce i umiejętności korzystania ze źródeł literaturowych. Doktorant umiejętnie interpretuje, analizuje wyniki wykonanych eksperymentów, przeprowadza dyskusję w oparciu o dane z cytowanego piśmiennictwa oraz poprawnie formułuje wnioski.

Przy lekturze rozprawy doktorskiej nasuwają się też pewne uwagi i pytania:

1. W rozdziale INNOWACYJNOŚĆ ROZPRAWY Doktorant sugeruje, że podjęta tematyka badań ukierunkowana na ocenę dynamiki i zależności procesów dotyczących funkcji mitochondriów, również z uwzględnieniem znaczenia mitofuzyny 2, jest oryginalną i nowatorską. Sformułowanie takie wydaje się zbyt śmiałe w kontekście cytowanych w opracowaniu, licznych wcześniejszych publikacji dotyczących tego zagadnienia. Sugestia, że omówione zależności zostały wykazane po raz pierwszy również wydaje się nie w pełni uzasadniona, natomiast z pewnością uzyskane wyniki uzupełniają one wiedzę w tym zakresie.
2. Jak można wytłumaczyć różną podatność/wrażliwość poszczególnych sektorów hipokampa na niedokrwienie/niedotlenienie; czy jest znane podłoże morfologiczne/biochemiczne tych różnic?
3. Ciekawym byłoby rozszerzenie wątku dotyczącego podobieństw i różnic między mitofuzyną 1 i 2, z uzasadnieniem wyboru do badań mitofuzyny 2.
4. Badania podstawowe są zwykle początkiem kolejnych etapów prowadzących do wykorzystania uzyskanych wyników w praktyce klinicznej; czy i w jakim zakresie, byłoby to możliwe w odniesieniu do mitofuzyny 2? Czy dotychczasowe dane dotyczące znaczenia mitofuzyny 2 w patologii różnych chorób, dają szanse na ich wykorzystanie w diagnostyce i przede wszystkim terapii chorób, co uzasadniałoby prowadzenie kolejnych badań.
5. Drobne uwagi zostały również zawarte bezpośrednio w tekście.


Powyższe uwagi, mają charakter marginalny i nie umniejszają wartości rozprawy. Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska Pana mgr Piotra Wojtyniaka wskazuje na posiadanie przez Autora szczegółowej wiedzy teoretycznej w wybranej dyscyplinie naukowej, potwierdza umiejętność i przygotowanie Doktoranta do dalszej samodzielnej pracy naukowej.



## OCENA KOŃCOWA

Uważam, że recenzowana praca Pana mgr Piotra Wojtyniaka „Rola mitofuzyny 2 w uszkodzeniu i regeneracji komórek w modelach ischemii i reperfuzji mózgu”, spełnia warunki stawiane rozprawom doktorskim, zgodnie z obowiązującą ustawą z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. z 2016r., poz 882, 1311, z 2017r. poz. 859).

Zwracam się do Rady Naukowej Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. Mirosława Mossakowskiego PAN w Warszawie z wnioskiem o dopuszczenie Pana mgr Piotra Wojtyniaka do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

  
dr hab. n. med. Ewa Nagańska