RN-BF 4000.4.2020
Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu
BIURO RPU 3331 2025
RADY DYSCYPLINY NAUKI FARMACEUTYCZNE
Podpis 26.02.2025

Ocena

Rozprawy doktorskiej mgr Katarzyny Lipke

Doktorantki Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu

Temat rozprawy:

Ocena wpływu lamiwudyny i zydowudyny oraz kwasu palmitynowego na komórki mikrogleju i neuronów dopaminergicznych jako potencjalnych czynników neurodegeneracyjnych

Szacuje się, że na świecie żyje ok. 38 milionów ludzi zakażonych wirusem HIV. Dostępna obecnie wysoce aktywna terapia antyretrowirusowa (HAART) sprawiła, iż u pacjentów którzy mają dostęp do leków i osiągają trwałą supresję wirusa, zakażenie wirusem HIV-1 stało się chorobą przewlekłą. Chociaż terapia HAART zaowocowała istotnym zmniejszeniem śmiertelność wśród pacjentów z AIDS, to jednak śmiertelność w tej grupie pacjentów jest około 5 razy wyższa niż u pacjentów zakażonych HIV, u których nie doszło do rozwoju AIDS. Pomimo zmniejszenia śmiertelności, dzięki nowoczesnej terapii antyretrowirusowej, ogólna śmiertelność pozostaje 6 razy wyższa u osób z HIV niż w populacji ogólnej.

Nukleozydowe inhibitory odwrotnej transkryptazy (NRTI) odgrywają kluczową rolę w leczeniu antyretrowirusowym i pozostają częścią obecnego standardu opieki. Jednak u pacjentów długotrwale przyjmujących te leki dochodzi do rozwoju niepożądanych zaburzeń, w tym zaburzeń neurologicznych, nawet gdy ładunek wirusowy jest niski. Te niepożądane efekty mogą być m.in. powiązane z toksycznością mitochondrialną spowodowaną wiązaniem się NRTI z ludzkim enzymem mitochondrialnej γ-polimerazy DNA, ale także mogą być ściśle połączone z samym zakażeniem wirusowym oraz innymi związanymi z tym zakażeniem lub stosowaną terapią zaburzeniami metabolizmu komórkowego. Mechanizmy leżące u podstaw rozwoju tych zaburzeń nie zostały dotąd wyjaśnione. To, czy i w jakim stopniu leki z grupy NRTI wpływają na rozwój procesów neurodegeneracyjnych oraz jakie inne czynniki modyfikują te procesy, wymaga więc udokumentowania. Przedstawiona do oceny praca wpisuje się w obszar działań, których celem jest wyjaśnienie tych mechanizmów. Ponadto w

realizowanym projekcie doktorskim zwrócono uwagę na rolę kwasów tłuszczowych i ich potencjalne działania toksyczne oraz rolę lipotoksyczności w rozwoju procesów neurodegeneracyjnych. Jest to niezwykle ważne zagadnienie, a wpływ dowozu i zmian metabolizmu kwasów tłuszczowych w różnych tkankach jest ciągle przedmiotem dyskusji i szczególne miejsce w tych dyskusjach zajmie wpływ kwasów tłuszczowych na działanie centralnego układu nerwowego. Dlatego, podjęcie badań w zakresie wpływu kwasów tłuszczowych na funkcje komórek centralnego układu nerwowego oraz porównania efektów wywoływanych przez kwasy tłuszczowe z efektami wywoływanymi przez leki z grupy nukleozydowych inhibitorów odwrotnej transkryptazy, należy uznać za ważne i dostarczające nowych danych w tym zakresie, gdyż w literaturze brak jest tego typu porównań. A należy mieć na uwadze, iż u pacjentów zakażonych wirusem HIV i poddawanych terapii antyretrowirusowej, dochodzi zarówno do zaburzeń metabolizmu lipidów jak i rozwoju procesów neurodegeneracyjnych.

Celem projektu była ocena, w oparciu o badania in-vitro na liniach komórkowych, wpływu na funkcje neuronów i mikrogleju dwóch leków z grupy nukleozydowych inhibitorów transferazy, lamiwudyny i zydowudyny, oraz wpływu kwasu palmitynowego, nasyconego kwasu tłuszczowego mogącego stymulować zaburzenia procesów komórkowych, jako potencjalnych czynników związanych z rozwojem procesów neurodegeneracyjnych.

Wyniki badań eksperymentalnych będących podstawą rozprawy doktorskiej zostały przedstawione w dwóch pracach oryginalnych opublikowanych w czasopismach o zasięgu międzynarodowym, łączny IF= 11.2. Ponadto integralnym elementem rozprawy jest praca poglądowa opublikowana w czasopiśmie o IF= 5,1, której tematyka jest ścisłe związana z tematyką rozprawy doktorskiej i praca ta jest 34-stronicowym opracowaniem przedstawiającym aktualny stan wiedzy na temat mechanizmów molekularnych lipotoksyczności i jej roli w rozwoju procesów patologicznych.

Przedstawiona do oceny praca nie jest jedynie zbiorem publikacji lecz odrębną monografią naukowa, której integralną częścią są wymienione publikacje. Zawiera streszczenie w języku polskim i angielski, wykaz skrótów oraz rozdziały obejmujące:

Wprowadzenie teoretyczne, Cel pracy, Materiał i Metody, Omówienie wyników badań (które już zostały opublikowane), Podsumowanie, Wnioski oraz Piśmiennictwo.

Wprowadzenie teoretyczne, w oparciu o bardzo starannie dobrane piśmiennictwo, omawia kluczowe zagadnienia niezbędne dla uzasadnienia założeń i celu pracy. Cel pracy został jasno określony. Precyzyjnie przedstawiono również sposób jego osiągnięcia poprzez określenie celów szczegółowych. Dokonano również opisu części doświadczalnej, w którym zaprezentowano stosowane metody i wykorzystywane materiały. Omówiono uzyskane wyniki i w omówieniu tym odnoszono się do publikacji będących integralnym elementem prezentowanej rozprawy doktorskiej. Praca zawiera podsumowanie kluczowych wyników badań opisanych w publikacjach oraz wnioski z nich wypływające. Przedstawiona rozprawa tworzy spójną całość pozwalającą ocenić zakres wykonanych badań, uzyskane wyniki oraz wynikające z nich wnioski a także zgodność przeprowadzonych badań i analiz z założonymi celami. Należy podkreślić, iż celem projektu doktorskiego jest zdobycie określonej wiedzy, umiejętności i kompetencji, a to owocuje uzyskaniem danych i ich prezentacją w formie prac publikowanych w czasopismach o uznanej pozycji w środowisku naukowym. Jednak nie tylko publikacje lecz także sposób przygotowania rozprawy i sposób przedstawienie realizacji badań projektu doktorskiego ma wpływ na ocenę dokonywaną przez recenzenta.

W badaniach eksperymentalnych skupiono się na wpływie badanych leków oraz kwasu palmitynowego na 1) rozwój zaburzeń funkcji mitochondriów oraz transportu i magazynowania kwasów tłuszczowych w komórkach mikrogleju, oraz na 2) rozwój stresu oksydacyjnego, zaburzeń transportu i magazynowania kwasów tłuszczowych oraz ocenie aktywności wybranych białek szlaku sygnałowego insuliny w komórkach neuronów dopaminergicznych. Badania prowadzono wykorzystując dwie linie komórkowe: linię HMC3 będącą modelem komórek mikrogleju oraz linię SH-SY5Y czyli linię wywodzącą się z ludzkich komórek neuroblastoma. W badaniach biochemicznych oceniano poziom ATP oraz mitochondrialnej frakcji anionorodnika ponadtlenkowego, wewnątrzkomórkowe stężenie białek wiążących kwasy tłuszczowe FABP4 i FABP5, poziom fosforylacji kinaz białkowych z rodziny MAPK (kinazy białkowe aktywowane mitogenem): ERK (kinaza regulowana sygnałem zewnątrzkomórkowym) i JNK (N-końcowa kinaza czynnika transkrypcyjnego c-Jun)

oraz kinazy p38, a także poziom fosforylacji białka PI3K (kinazy 3'-fosfatydyloinozytolu), stężenia InsRS1 (substratu 1 receptora insulinowego) oraz ekspresję InsR (receptora insulinowego). Określano również poziom akumulacji lipidów w badanych komórkach w oparciu o barwienie cytoplazmatycznych kropli lipidowych za pomocą Red-Oil-O. Należy podkreślić, iż oceniając wpływ badanych leków stosowano stężenia analizowanych substancji odpowiadające ich stężeniom w surowicy pacjentów leczonych standardowymi dawkami. Zastosowane stężenia kwasu palmitynowego odpowiadały średniemu stężeniu obserwowanemu u ludzi zdrowych oraz stężeniu ponad dwukrotnie większemu, a stosowany jako kontrola kwas DHA był stosowany w analogicznych stężeniach jak kwas palmitynowy.

Uzyskane wyniki pokazują, iż w komórkach mikrogleju badane nukleozydowe inhibitory odwrotnej transkryptazy obniżały poziom ATP i jednocześnie powodowały wzrost poziomu ROS (reaktywnych form tlenu), obniżały poziom białek wiążących kwasy tłuszczowe FABP4 i FABP5 oraz stymulowały wzrost akumulacji lipidów. W komórkach neuronów dopaminergicznych badane leki z grupy NRTI również wywoływały wzrost stresu oksydacyjnego. Ponadto powodowały istotne obniżenie poziomu FABP4 oraz wzrost aktywacji kinazy regulowanej sygnałem zewnątrzkomórkowym (ERK). Natomiast inkubacja komórek z lekami z grupy NRTI powodowała spadek akumulacji lipidów w neuronach dopaminergicznych. Zaprezentowane wyniki ukazują wpływ leków z grupy NRTI na rozwój stresu oksydacyjnego związanego z zaburzeniem funkcji mitochondriów. Bardzo interesujące są cytowane powyżej obserwacje dotyczące wpływu badanych leków na metabolizm lipidów w komórkach centralnego układu nerwowego. Stymulują one do zadawania pytań i kontynuacji badań, w tym m.in. badań odpowiadających na pytanie jaki jest mechanizm obserwowanych zmian, jak odnotowane różnice w poziomie akumulacji lipidów w różnych komórkach OUN wpływają na ich funkcje, czy badane leki pływają na napływ do komórek różnych kwasów tłuszczowych, czy zmieniają wychwyt kwasów wielonienasyconych.

Zainteresowania Doktorantki koncentrowały się również na ocenie wpływu kwasu palmitynowego na stosowane w badaniach modelowe komórek OUN i udokumentowaniu roli tego kwasu w rozwoju procesów neurodegeneracyjnych, w tym w mechanizmie związanym z jego działaniem lipotoksycznym. W prezentowanym

modelu badawczym stawiana hipoteza nie została potwierdzona. Analiza przedstawionych danych wskazuje, iż biologiczne efekty kwasu palmitynowego nie różniły się od efektów wywoływanych przez DHA. Dotyczy to m.in. wpływu na poziom anionorodnika ponadtlenkowego, poziom FABP4 i FABP5 czy poziom akumulacji lipidów. Biorąc pod uwagę, iż kwas palmitynowy jest kwasem syntetyzowanym przez komórki organizmu człowieka w procesie syntezy *de-novo*, należy zadać pytanie: czy rzeczywiście należy zakładać bezwzględnie toksyczne działanie tego kwasu na nasze komórki. Należy odróżnić wpływ stężeń obserwowanych u ludzi zdrowych, odżywiających się zgodnie z ogólnie przyjętymi zasadami, od wpływu stężeń kilku- a nawet kilkunastokrotnie wyższych, stosowanych w wielu badaniach. Należy także zwrócić uwagę na obecność i rolę czynników modyfikujących biologiczne efekty tego kwasu, np. czynników związanych z obecnością procesów patologicznych. Warto również zauważyć, iż porównując rozwój miażdżycy naczyń mózgowych oraz naczyń wieńcowych, zauważamy inną siłę oddziaływania kluczowych czynników ryzyka, w tym zaburzeń gospodarki lipidowej. Wiemy również, że różne tkanki i narządy posiadają charakterystyczne profile metaboliczne, co utrudnia przewidywanie wpływu określonych czynników na analogiczne procesy zachodzące w różnych tkankach i narządach. Mam nadzieję, iż w trakcie obrony Doktorantka ustosunkuje się do tych zagadnień i podejmie dyskusję na ten temat. Mam też nadzieję, iż przedstawi swoje dalsze plany badawcze.

Podsumowując, należy podkreślić trafność podjętej tematyki badawczej i znaczenie uzyskanych wyników dla celów poznawczych, a także dla stymulowania dalszych badań w zakresie wpływu leków z grupy nukleozydowych inhibitorów odwrotnej transkryptazy oraz kwasów tłuszczowych na rozwój procesów neurodegeneracyjnych, w tym modyfikację metabolizmu lipidów w komórkach centralnego układu nerwowego. Towarzyszy temu jasne wyznaczenia celu badania i drogi prowadzącej do jego realizacji, trafność doboru i umiejętne wykorzystania wybranych metod i narzędzi badawczych.

Oceniana rozprawa doktorska mgr Katarzyny Lipke spełnia warunki określone w art. 187 ust. 1 i 2 ustawy Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r, poz. 1668 ze zm.) .

Wobec powyższego przedkładam Wysokiej Radzie Dyscypliny Nauk Farmaceutycznych Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu wniosek o dopuszczenie pani mgr Katarzyny Lipke do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia naukowego doktora.

Jednocześnie składam wniosek w wyróżnienie rozprawy. Podstawą rozprawy jest cykl 3 prac opublikowanych w języku angielskim w różnych czasopismach o zasięgu międzynarodowym. Łączny IF publikacji to 16.3 a punktacja MNiSW to 380 punktów. Ponadto należy podkreślić, iż rozprawa nie koncentruje się tylko na przedstawieniu cyklu publikacji, ale zawiera także omówienie podstaw teoretycznych istotnych dla uzasadnienia celu prowadzonych badań oraz szerokie omówienie wyników prowadzonych prac eksperymentalnych. Ponadto odnosi się również do znaczenia danych prezentowanych w pracy poglądowej dla uzasadnienia celu badań oraz dyskusji uzyskanych wyników. Przedstawiona monografia daje głębszy niż same publikacje wgląd w zakres prac prowadzonych przez Doktorantkę. Na podkreślenie zasługuje również fakt, iż Doktorantka jest pierwszym autorem wszystkich publikacji będących podstawę przedstawionej rozprawy i Jej wiodący udział nie budzi wątpliwości recenzenta, a współautorami tych publikacji są Promotor i Promotor Pomocniczy.

Warszawa, 24.02.2025

Prof. dr hab. n. farm. Grażyna Nowicka