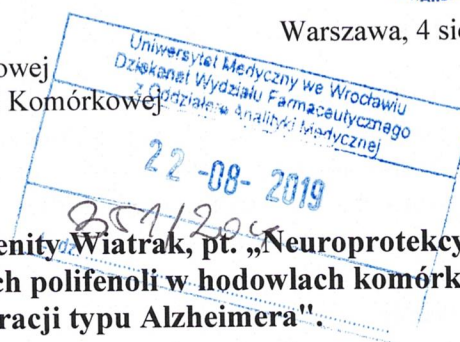


Prof. dr hab. Jacek Jaworski
Pracownia Neurobiologii Molekularnej i Komórkowej
Międzynarodowy Instytut Biologii Molekularnej i Komórkowej
Ks. Trojdena 4, 02-109 Warszawa

Warszawa, 4 sierpnia 2019 r.



Ocena rozprawy doktorskiej mgr Benity Wiatrak, pt. „Neuroprotektoryjne i neuroregeneracyjne działanie wybranych polifenoli w hodowlach komórkowych w modelu neurodegeneracji typu Alzheimer”.

Przedmiot rozprawy i jego naukowe znaczenie

Choroba Alzheimera (AD) jest jednym z największych wyzwań przed jakimi stoją zarówno nauki biologiczne, jak i medycyna. W związku ze starzeniem się społeczeństw i zmianą stylu życia liczba pacjentów zapadających na tę dewastującą i śmiertelną chorobę wzrasta w zaskakującym tempie. Fakt przewlekłości tej choroby odbija się nie tylko na pacjentach, ale także na ich rodzinach i budżecie przeznaczonym na opiekę zdrowotną. Pomimo, wieloletnich badań nad mechanizmami choroby Alzheimera, wciąż dokładna przyczyna pozostaje nieznana i jest przedmiotem wielu hipotez, od najpowszechniejszej amyloidowej do AD jako cukrzycy typu III. Przekłada się to bezpośrednio na brak efektywnych leków zapobiegających chorobie lub w sposób znaczący ją opóźniających a kolejne obiecujące badania kliniczne zawodzą pokładane w nich nadzieje. Jednym z kierunków badań, związanych z obniżaniem stanu zapalnego w mózgu oraz nadmiernej produkcji wolnych rodników jest wykorzystanie naturalnie występujących w roślinach polifenoli, jako substancji terapeutycznych. Jednak wykorzystanie pojedynczych polifenoli wciąż nie dostarcza, z różnych względów, satysfakcjonujących wyników. Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska Pani magister Benity Wiatrak opisuje wyniki badań, których bezpośrednim celem było wszechstronne porównanie neuroprotektoryjnego i neuroregeneracyjnego wpływu 3 polifenoli, kurkuminy, *trans*-resweratolu oraz wogoniny i ich kombinacji, na komórki PC12 poddane w hodowli *in vitro* działaniu A β ₂₅₋₃₅. Natomiast celem długofalowym było wybranie optymalnej kombinacji polifenoli do badań w bardziej zaawansowanych modelach badawczych choroby Alzheimera. W kontekście opisanych powyżej niepowodzeń i wyzwań związanych z poszukiwaniem skutecznych substancji leczniczych w chorobie Alzheimera podjęty przez Doktorantkę temat badań jest bardzo adekwatny i istotny. W swoich badaniach, Doktorantka z jednej strony wykorzystwała bardzo wszechstronne podejście eksperymentalne (wykorzystanie kilkunastu metod oznaczania stanu komórek PC12; modele neuroprotekcji i neuroregeneracji, warunki normoksji i fizjoksji), zaś z drugiej szereg zaawansowanych metod statystycznych pozwalających na skomplikowane porównania korelacji międzygrupowych. W efekcie przeprowadzonych badań i analiz, Doktorantka, doszła do wniosku, iż wybrane zestawy polifenoli działają bardziej skutecznie niż pojedyncze związki a ich efekt był silniejszy w układach neuroregeneracji niż neuroprotekcji. Inną ciekawą i istotną obserwacją było to, iż związki te najsilniej wpływają na różnicowanie i rozwój komórek PC12 poddanych uprzednio toksycznemu działaniu A β ₂₅₋₃₅, natomiast efekty na przeżywalność komórek i poziom wolnych rodników były dużo mniej spektakularne. Obserwacja ta, jeśli potwierdzi się w układach *in vivo*, może nieść nadzieję, iż stosowanie tych związków będzie opóźniać wystąpienie objawów neurologicznych AD wspomagając efektywność tych neuronów, które nie uległy neurodegeneracji. Przedstawione wyniki nie dostarczają ostatecznej odpowiedzi czy wybrany zestaw polifenoli znajdzie zastosowanie praktyczne, jednak stanowią dobry punkt wyjścia do dalszych badań o potencjalnie dużym znaczeniu praktycznym dla zdrowia człowieka.

Formalny opis rozprawy

Rozprawa licząca w sumie 191 stron ma układ dość nietypowy dla rozpraw doktorskich, przynajmniej tych recenzowanych przeze mnie do tej pory. Rozprawę rozpoczyna dwustronicowy Wstęp, który dość pobieżnie uzasadnia konieczność podjęcia badań opisywanych w recenzowanej pracy doktorskiej. Na dobrą sprawę tytuł tego podrozdziału powinien brzmieć – „Uzasadnienie podjęcia badań” i prawdopodobnie powinna być to ostatnia część Wstępu podsumowująca go i poprzedzająca „Cele rozprawy”, które są drugim rozdziałem zatytułowanym „Cele badań własnych”. Po tym rozdziale następuje rozdział zatytułowany „Choroba Alzheimerera – wybrane zagadnienia”. Liczy on 32 strony i zawiera 4 główne podrozdziały, które wprowadzają czytelnika w zakres badań opisanych w rozprawie. Zatem ten rozdział pełni *de facto* funkcję prawdziwego wstępu. Następny rozdział został zatytułowany również dość nietypowo. Zamiast Materiałów i Metod w recenzowanej rozprawie znajdujemy rozdział „Część doświadczalna”. Liczy on 19 stron i opisuje w 7 podrozdziałach wykorzystywane materiały i metody doświadczalne oraz statystyczne. Rozdział V zatytułowany jest „Wyniki i ich omówienie”. Liczy on 42 strony i zawiera tylko część uzyskanych wyników wraz z ich analizą statystyczną. Uzyskane wyniki, podzielone zostały na 5 głównych podrozdziałów, które można pogrupować w 3 części tematyczne dotyczące: opisu wykorzystywanego układu doświadczalnego, oceny działania pojedynczych wybranych polifenoli na komórki PC12 poddane działaniu $A\beta_{25-35}$ i oceny działania zestawów badanych polifenoli w identycznych układach doświadczalnych. Przy czym podrozdziały 4 i 5 dotyczą wyników bardziej zaawansowanych analiz statystycznych działania zestawów polifenoli. Następująca po tym rozdziale 23-stronicowa Dyskusja omawia uzyskane wyniki w kontekście istniejącej wiedzy. Po Dyskusji następują Wnioski, Piśmiennictwo (liczące 282 pozycje), Wykaz skrótów, Spis tabel i rycin oraz liczące ponad 40 stron, czyli mniej więcej tyle samo co rozdział „Wyniki i ich omówienie” „Materiały Uzupełniające”. W „Materiałach Uzupełniających” podzielonych na 3 części umieszczono tak naprawdę większość danych pierwotnych uzyskanych w ramach prowadzonych badań. Rozprawa kończy się streszczeniami w języku polskim i angielskim. W rozprawie, w części głównej (tzn. z pominięciem „Materiałów uzupełniających”) umieszczono 22 tabele oraz 35 rycin nazywanych schematami, mikrofotografiami lub rycinami. Te ostatnie zawierają głównie wykresy. Podsumowując rozprawa pani mgr Benity Wiatrak ma układ nieortodoksyjny, niemniej zawiera wszystkie części i informacje pojawiające się również w rozprawach o układzie klasycznym. Natomiast uważam, że wyłączenie większości uzyskanych w ramach prowadzonych eksperymentów danych do „Materiałów uzupełniających” jest niewłaściwe i utrudnia zarówno analizę uzyskanych wyników, jak i ocenę rozprawy.

Ocena merytoryczna

Wstęp ocenianej rozprawy, jak wspomniano już powyżej, jest dwustronicowy. Dlatego w tej części swojej recenzji skupię się na łącznym omówieniu rozdziałów I i III, które stanowią rzeczywisty wstęp. Szczególnie w rozdziale III zostały omówione wszystkie zagadnienia konieczne dla zrozumienia uzyskanych wyników i podjętej tematyki badawczej. Pierwszy podrozdział rozdziału III dotyczy patogenezы choroby Alzheimerera, drugi potencjalnych mechanizmów rozwoju tej choroby (np. stres oksydacyjny czy reakcje zapalne), trzeci w końcu skupia się na $A\beta_{25-35}$ i jego bardzo różnorodnych rolach w patogenezie AD. Ponieważ tematyka tych trzech podrozdziałów w pewnej części się nakłada Doktorantce nie do końca udało się unikać powtarzania części informacji. Czwarty podrozdział dotyczy polifenoli i ich dotychczasowego wykorzystania w badaniach nad neurodegeneracją. W mojej ocenie Wstęp jest napisany bardzo sprawnie i nie mam poważniejszych uwag. Mam jednak kilka uwag

drobnych, które w mojej ocenie dotyczą skrótów myślowych dokonanych przez Doktorantkę, które jednak powinny zostać sprostowane w trakcie obrony. Na przykład na str. 19 Doktorantka napisała, iż oligomery A β ₂₅₋₃₅ dyfundują do komórki na drodze endocytozy. Czy Doktorantka mogłaby rozwinąć tę myśl? Bo pomimo tego, iż zajmuję się biologią komórki od prawie 20 lat nigdy nie słyszałem o dyfuzji na drodze endocytozy. Z kolei, na stronie 28 znalazłem informację, iż szlaki endosomów prowadzą do mitochondriów. Przyznam, iż nie wiem co Autorka miała na myśli. Będę wdzięczny za wyjaśnienia w trakcie obrony rozprawy.

Cele rozprawy. Jako główny cel rozprawy Doktorantka postawiła sobie ocenę wpływu wybranych polifenoli, kurkuminy, *trans*-resweratolu i wogoniny i ich kombinacji, na hodowlę komórek linii PC12 inkubowanych z A β ₂₅₋₃₅. W dalszej części tego podrozdziału Autorka opisuje jak zamierza to osiągnąć, co znowu jest zabiegiem dość niestandardowym. Zabrakło mi, natomiast, sformułowania celów bardziej szczegółowych, które przyświecały w mojej ocenie Doktorantce, np. (i) porównanie wpływu neuroprotekcynowego i neuroregeneracyjnego badanych związków czy (ii) porównanie wpływu normoksji i fizjoksji na toksyczność A β ₂₅₋₃₅ czy potencjał terapeutyczny badanych polifenoli. Niemniej sam cel główny oceniam jako dobrze sformułowany, adresujący istotny problem badawczy i adekwatny do hipotezy stawianej przez Doktorantkę, iż zestawy polifenoli o różnych właściwościach powinny być skuteczniejsze niż pojedyncze związki w zapobieganiu efektom A β ₂₅₋₃₅.

Materiały i Metody. Wszystkie metody niezbędne do realizacji założonych celów zostały w mojej ocenie opisane w sposób dokładny i zrozumiały dla osób dysponujących odpowiednim doświadczeniem i umiejętnościami. Na szczególną pochwałę zasługuje fakt, iż w ocenie poszczególnych właściwości komórek PC12, tam gdzie było to możliwe Doktorantka starała się stosować kilka alternatywnych metod. Na podkreślenie zasługuje również interesujące podejście do analizy danych w oparciu o analizę wielokryterialną. W tym kontekście zastanawiam się tylko, dlaczego testowi MTT przyznano dość wysoką wagę pomimo, iż dane publikowane, jak i wyniki przedstawione w niniejszej rozprawie, wskazują, iż test ten w przypadku wybranego modelu badawczego mierzy dwie niezależne cechy, w tym jedną nie związaną bezpośrednio z dobrostanem komórek PC12. Z uwag drobniejszych uważam, iż w Tabeli 2 warto było podać nie tylko liczbę wysiewanych komórek, ale też rodzaj wykorzystywanych szalek. Ta informacja znajduje się dalej w tekście, ale taki zabieg ułatwiłby szybkie uzyskanie istotnych informacji przez czytelnika.

Wyniki. Pierwsza, część rozdziału Wyniki opisuje wyniki testów mających na celu określenie toksyczności zarówno A β ₂₅₋₃₅ jak i poszczególnych polifenoli w wykorzystywanych układach i warunkach doświadczalnych (tzn. neuroprotekcji i neuroregeneracji; normoksji i fizjoksji). Co ciekawe, podanie A β ₂₅₋₃₅ w dowolnym układzie doświadczalnym, poza testem MTT, miało znikomy efekt w testach opisujących żywotność komórek (rzędu kilku procent). W tym kontekście zastanawiam się, czy stężenia stosowanego A β ₂₅₋₃₅ nie były zbyt niskie a testom tym nie przypisano zbyt wysokiej wagi w analizie wielokryterialnej. Z kolei, A β ₂₅₋₃₅ miał silny efekt na parametry związane z różnicowaniem i wzrostem komórek PC12. Natomiast zmiany w poziomie reaktywnych form tlenu (RFT), nawet jeśli są statystycznie istotne, biologicznie są zaniedbywalne, co znowu prowadzi do pytania zadanego przeze mnie powyżej. Druga część wyników przedstawia efekty podania osobno wybranych polifenoli na wpływ A β ₂₅₋₃₅ na komórki PC12 w różnych układach badawczych. Generalnie wydaje się, iż efekty pojedynczych polifenoli są dość umiarkowane. Jednak, szczególnie w ocenie przeżywalności, rodzi się pytanie czy jakiegokolwiek efekty powinny być obserwowane skoro wybrana dawka A β ₂₅₋₃₅ w mojej ocenie miała znikomy efekt opisany w części I wyników. Dlatego uważam, iż pominięcie w eksperymentach opisywanych w II i III części wyników wariantu komórek

PC12 nietraktowanych $A\beta_{25-35}$ za poważne ograniczenie niniejszej rozprawy. W końcu, w III części rozprawy Doktorantka opisuje wpływ zestawów polifenoli na cechy komórek PC12 traktowanych $A\beta_{25-35}$. W efekcie tych badań jak również analiz statystycznych przeprowadzonych w części IV i V Wyników, Autorka dochodzi do wniosku, iż optymalną kombinacją związków jest łączne podanie kurkuminy i *trans*-resweratolu, w zasadzie niezależnie od warunków hodowli lub kombinacji wszystkich 3 związków w układzie neuroregeneracji. Zasadniczo przedstawione wyniki wskazują, iż działanie polifenoli było dużo bardziej skuteczne w korekcji badanych parametrów właśnie w układzie neuroregeneracji.

W mojej ocenie do szczególnie wartościowych aspektów niniejszej rozprawy i uzyskanych wyników należy zaliczyć wszechstronne podejście eksperymentalne, o którym już pisałem i zastosowanie licznych układów eksperymentalnych i zaawansowanych analiz statystycznych pozwalających szukać istotnych korelacji. Jednak w moim przekonaniu jest kilka słabych stron przedstawionych badań. Pierwszy to wybór komórek. Przy dzisiejszej dostępności i łatwości hodowli komórek neuronalnych, jak również możliwości hodowli komórek bezpośrednio od pacjentów, wybór komórek PC12 wydaje mi się nieoptymalny, pomimo wielkiego wysiłku jaki Autorka włożyła w uzasadnienie tego wyboru. Drugi problem, to oczywiście adekwatność w ogóle modeli *in vitro* w kontekście badania polifenoli, o których słabej biodostępności Doktorantka pisze we Wstępie rozprawy. Inną słabą stroną jest to, iż nie zilustrowano przykładowymi zdjęciami wyników analiz mikroskopowych, co jest absolutnym standardem. Natomiast w niniejszej rozprawie otrzymujemy tylko wyniki w postaci tabel czy wykresów. W końcu, jak pisałem już powyżej umieszczenie w materiałach dodatkowych większości wyników źródłowych, na bazie których przeprowadzono metaanalizy jest w moim przekonaniu niewłaściwe w przypadku niniejszej rozprawy. Takie zabiegi można stosować przy badaniach wysokoprzepustowych czy multiomicznych, do których nie należą eksperymenty opisane w niniejszej rozprawie.

Jednak pomimo moich uwag krytycznych, badania opisane w podrozdziale Wyniki dostarczają wielu ciekawych informacji w kontekście wyboru kombinacji polifenoli do dalszych badań w bardziej zaawansowanych modelach badawczych.

Dyskusja. Dyskusja przedstawionej mi do oceny rozprawy doktorskiej pani mgr Wiatrak pokazuje, iż Doktorantka posiada dużą wiedzę i zdolność trafnego podsumowania uzyskanych wyników na tle istniejącej wiedzy. Choć uważam, iż Dyskusja zyskałaby gdyby w kilku miejscach Autorka szybciej przeszła do meritum zamiast pisać o rzeczach luźno związanych z tematem, których nie badała. Dobrym przykładem jest prawie cała str. 103 dotycząca transkrypcji zależnej od czynników transkrypcyjnych HIF. Naprawdę czytając dalszą część dyskusji nie mogłem dojść co te informacje wnoszą. W innych przypadkach związek takich rozbudowanych wprowadzeń wyjaśniał się dopiero 2-3 strony dalej. Być może zarysowanie problemu i omawianie go w kontekście podawanej wiedzy ułatwiłoby czytelnikowi zrozumienie dyskusji.

Jest też w Dyskusji jeden wątek, z którym nie do końca jestem się w pełni zgodzić. Na podstawie dość słabej korelacji poziomu RFT i pęknięć DNA Autorka w Dyskusji konkluduje, iż pęknięcia DNA, które obserwowała muszą być efektem bezpośredniego działania $A\beta_{25-35}$ na DNA. Jest to jednak wniosek nieuprawniony bez przeprowadzenia dodatkowych analiz, w tym przede wszystkim wykazania, iż w stosowanych przez Doktorantkę warunkach $A\beta_{25-35}$ rzeczywiście wnikał do jądra i wiązał się z DNA. Co więcej Doktorantka pisze, iż w potwierdzeniu penetracji do jąder komórkowych przydatny okazał się

test FHA. Jest to po prostu nieprawda. Test ten w żadnym stopniu nie mierzy przenikania czegokolwiek do jądra. Mierzy tylko efekt genotoksyczny.

Wnioski. Choć jest to rozdział bardzo krótki zasługuje w moim przekonaniu na szczególną pochwałę. Wnioski przedstawione przez Doktorantkę są bardzo syntetyczne i prawidłowe. Doktorantce udało się uniknąć wysnuwania zbyt daleko idących wniosków na podstawie danych, które choć statystycznie istotne najprawdopodobniej mają nikłe znaczenie biologiczne.

Ocena edytorskiej strony rozprawy

Przedstawiona mi do oceny rozprawa jest przygotowana w przeważającej części starannie i Doktorantce udało się uniknąć większej liczby błędów edytorskich. Mam jednak kilka uwag krytycznych. Pierwsza uwaga dotyczy się mikrofotografii zamieszczonych w rozprawie (np. str. 50, 52, czy 54). W mojej ocenie zamieszczone zdjęcia są dość słabej jakości. Być może jest to kwestia wydruku. Jeśli jednak większość z nich wygląda w oryginale w ten sposób, ich analiza byłaby mniej wiarygodna i utrudniona w porównaniu do zdjęć mikroskopowych dobrej jakości. Ponadto, na większości mikrofotografii zabrakło skali co nie powinno mieć miejsca. Podobnie jak umieszczanie jej na dużej części pola widzenia. Na mikrofotografii 1 pojawiły się strzałki ale brak ich objaśnienia w opisie ryciny raczej nie pomaga zrozumieć co one oznaczają. Pozostałe moje uwagi dotyczą kilku niefortunnych sformułowań, które pojawiły się w tekście a nie są zgodne z przyjętym nazewnictwem naukowym. Można do nich zaliczyć rafty lipidowe (poprawnie tratwy lipidowe), porastanie neurytów (zakładam, że chodzi o wzrost neurytów) czy siarczan heparynu (poprawna nazwa to siarczan heparanu). Ponadto, chciałbym Doktorantce zwrócić uwagę na przyszłość, że w języku polskim słowa ilość i liczba nie są tożsame i nie powinny być stosowane wymiennie, co zdarza się nagminnie w tekście przedstawionej mi do oceny rozprawy. W końcu, część skrótów w tekście nie była rozwinięta a ich wyjaśnienie nie znalazło się też w wykazie skrótów pod koniec pracy doktorskiej.

Wniosek końcowy

Podsumowując, stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska pani mgr Benity Wiatrak spełnia wymagania określone odpowiednimi przepisami. Wyniki zostały uzyskane za pomocą adekwatnych metod i przyczyniły się do poszerzenia naszej wiedzy na temat wpływu wybranych polifenoli i ich kombinacji na stan komórek PC12 poddanych działaniu A β ₂₅₋₃₅. W związku z tym wnoszę do Rady Naukowej Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Analityki Medycznej Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu o dopuszczenie pani mgr Benity Wiatrak do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Prof. dr hab. Jacek Jaworski