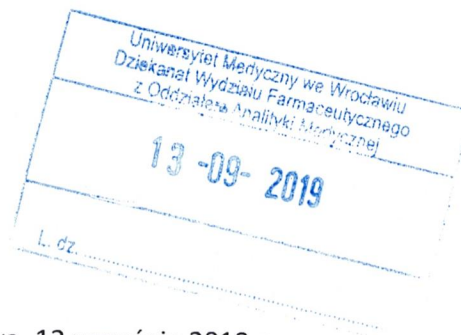


Prof. dr hab. Urszula Wojda  
Kierownik Pracowni Badań Przedklinicznych  
o Podwyższonym Standardzie, Centrum Neurobiologii,  
Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN  
tel: (4822) 5892578; email: u.wojda@nencki.gov.pl



Warszawa, 12 września 2019 r.

### Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr inż. Benity Wiatrak

pt. „**Neuroprotektoryjne i neuroregeneracyjne działanie wybranych polifenoli w hodowlach komórkowych w modelu neurodegeneracji typu Alzheimer**”

wykonanej pod kierunkiem prof. dr hab. Kazimierza Gąsiorowskiego w Katedrze i Zakładzie Podstaw Nauk Medycznych Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu

### Ocena merytoryczna

Tematyka przedstawionej mi do oceny rozprawy doktorskiej jest istotna poznawczo i zarazem może być w przyszłości wykorzystana w praktyce. Pani mgr inż. Benita Wiatrak podjęła badania, których celem była analiza potencjału neuroprotektoryjnego i neuroregeneracyjnego trzech polifenoli roślinnych: kurkuminy, *trans*-resweratrolu i wogoniny oraz ich zestawów. Badania przeprowadzono z wykorzystaniem komórkowego modelu neurodegeneracji typu Alzheimerowskiego, który stanowiły zróżnicowane pod wpływem czynnika wzrostu nerwów komórki linii PC12 pochodzące z guza chromochłonnego nadnerczy szczura, inkubowane z peptydem amyloidowym A $\beta$ <sub>25-35</sub>.

Choroba Alzheimer (AD), najczęściej występująca choroba neurodegeneracyjna, stanowi wciąż narastające wyzwanie dla dzisiejszej medycyny, ponieważ odnotowuje się wzrost liczby pacjentów na świecie, a zarazem brakuje skutecznych metod zapobiegania i leczenia tej choroby. Nadzieją jest wyjaśnienie złożonych mechanizmów molekularnych patogenezы AD i wskazanie adekwatnych nowych metod prewencji i terapii. Jeden z obiecujących kierunków takich badań zakłada wykorzystanie polifenoli roślinnych, ze względu na ich aktywność antyoksydacyjną i przeciwzapalną, istotną w kontekście stresu oksydacyjnego i reakcji stanu zapalnego jako ważnych składowych patomechanizmu AD. Oceniana praca doktorska wykonana została pod kierunkiem Pana prof. dr hab. Kazimierza Gąsiorowskiego w Katedrze i Zakładzie Podstaw Nauk Medycznych Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu, gdzie od lat z sukcesami prowadzone są badania oceniające *in vitro* aktywności związków pochodzenia naturalnego, jak i syntetycznych, o potencjalnych właściwościach leczniczych.

W ocenianej pracy doktorskiej w pierwszym etapie ustalono i zoptymalizowano układy doświadczalne do badania aktywności polifenoli i ich zestawów. W układzie badania neuroprotekcji zróżnicowane komórki PC12 inkubowano najpierw z badanymi polifenolami, a następnie z peptydem A $\beta$ <sub>25-35</sub>. Odwrotna kolejność inkubacji pozwoliła zbadać zdolność polifenoli do odbudowy uszkodzonych

pod wpływem A $\beta$  komórek neuronalnych. Dla każdego z układów doświadczalnych zbadano także efekty działania polifenoli i ich zestawów w zależności od warunków stężenia tlenu w prowadzonych hodowlach komórek – w normoksji i fizjoksji. We wszystkich układach doświadczalnych oceniono trzy główne aspekty oddziaływania polifenoli na komórki, obejmujące: 1) żywotność komórek, 2) poziomu stresu oksydacyjnego i uszkodzeń DNA oraz 3) zróżnicowanie i cechy fenotypowe komórek. Wyniki badań i ich analiza pozwoliły na sformułowanie jednoznacznych wniosków. Okazało się, że wszystkie trzy polifenole wykazywały zarówno działanie neuroprotekcyjne, jak też neuroregeneracyjne. Najciekawsze wnioski przyniosło badanie zestawów polifenoli. Stwierdzono, że wskaźniki siły działania zestawów polifenoli zależą od układu badawczego, warunków hodowli komórek, a także składu zestawu. Zestawy polifenoli charakteryzowały się silniejszym działaniem neuroregeneracyjnym niż neuroprotekcijnym. W obu układach doświadczalnych zestawy polifenoli wykazywały silniejszy efekt w warunkach fizjoksji niż w normoksji. Największą siłą działania, wyższą niż poszczególne polifenole stosowane osobno, wykazywał zestaw kurkumina + *trans*-resweratrol, zarówno w układzie badania neuroprotekcji, jak też neuroregeneracji. Poza zestawem kurkumina + *trans*-resweratrol, do dalszych badań potencjału neuroregeneracyjnego wytypowano także zestaw wszystkich trzech polifenoli, wraz z wogoniną. Ponadto, na podstawie wyników badań wyciągnięto szereg wniosków, omówionych wyczerpująco w *Dyskusji*, na temat prawdopodobnego mechanizmu działania neuroprotekcijnego i neuroregeneracyjnego poszczególnych polifenoli oraz ich zestawów. Uzyskane wyniki i ich analiza stanowią wkład nie tylko w rozwój nowych metod zapobiegania i leczenia AD, ale także w odszyfrowanie złożonych mechanizmów molekularnych neuroprotekcji i neuroregeneracji pod wpływem badanych polifenoli. Co ważne, rezultaty badań inspirują do formułowania kolejnych pytań, odkrywają zatem nowe horyzonty poznawcze.

### Ocena metodologiczna

Zakres doświadczalny pracy i warsztat metodyczny jest szeroki, dobór metod i narzędzi badawczych odpowiedni dla realizacji celu projektu i umiejętnie zastosowany. Przeprowadzone badania bazują na technikach biologii komórki i biochemii, obejmujących hodowle i różnicowanie komórek linii PC12 i ich analizę z zastosowaniem metod mikroskopii świetlnej i fluorescencyjnej oraz szereg testów biochemicznych, w tym spektrofotometrycznych i spektrofluorymetrycznych. Do analizy aktywności polifenoli i ich zestawów w hodowlach komórek PC12 we wszystkich układach doświadczalnych zastosowano w sumie 11 metod pozwalających na ocenę: 1) żywotności komórek, 2) poziomu stresu oksydacyjnego i uszkodzeń DNA oraz 3) różnicowania i cech fenotypowych komórek. Oceny żywotności komórek dokonano z zastosowaniem testów spektrofotometrycznych MTT, SRB, oraz kolorymetrycznego testu LDH, jak też mikroskopowej analizy apoptozy i nekrozy po znakowaniu aneksyną V i jodkiem propidyny. Do oceny poziomu wewnątrzkomórkowych reaktywnych form tlenu zastosowano test DCF-DA, a do oceny stopnia pęknięć nici DNA - test FHA dyfuzji DNA. Ocena różnicowania komórek obejmowała mikroskopową analizę zagęszczenia neurytów oraz poziomu białkowych markerów różnicowania neuronalnego DCX i NeuN, a także spektrofotometryczną ocenę porostania neurytów. Szczególne uznanie budzi zaawansowana analiza statystyczna, obejmująca dobór testów parametrycznych i nieparametrycznych na podstawie wyników analizy normalności rozkładu i jednorodności wariancji, zastosowanie analizy korelacji rang Spearmana dla oceny zależności pomiędzy parami zmiennych oraz modeli regresji w celu wyznaczenia zależności cytotoksyczności od stężenia badanych polifenoli. W celu oceny działania zestawów polifenoli zastosowano analizę siły efektów, a

---

#### Pracownia Badań Przedklinicznych o Podwyższonym Standardzie,

Centrum Neurobiologii, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego,  
ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa.

Kierownik: Prof. dr hab. Urszula Wojda, tel. (48 22) 589 2578, e-mail: u.wojda@nencki.gov.pl

istotność różnic w wynikach zbiorczych wyznaczono z zastosowaniem wieloczynnikowej, wielowymiarowej analizy wariancji MANOVA. Dobór metod analizy statystycznej jak i wszystkich testów i układów doświadczalnych jest przemyślany i dobrze uzasadniony, a badania zostały konsekwentnie przeprowadzone.

### **Ocena formalnej i edytorskiej strony rozprawy**

Rozprawa przygotowana jest zgodnie z obowiązującymi zasadami, ma klasyczną strukturę prac doktorskich, które nie są zbiorem opublikowanych artykułów. Dysertacja liczy 191 stron. Po spisie treści znajdujemy krótki *Wstęp* streszczający główne przesłanki do podjęcia badań oraz następnie krótkie sformułowanie celu badań. Założenia i cele badań przedstawiono przejrzysto. W dalszej części zamieszczony został liczący 36 stron właściwy wstęp do pracy, zatytułowany „Choroba Alzheimera – wybrane zagadnienia”. Lektura tego rozdziału pozwala stwierdzić, że Doktorantka dysponuje imponująco szeroką wiedzą w uprawianej dziedzinie. Ta część pracy to prawdziwe kompendium molekularnych mechanizmów choroby Alzheimera ze szczególnym uwzględnieniem roli peptydów amyloidowych, stresu oksydacyjnego i stanu zapalnego. We wstępie uzasadniono także wybór peptydu A $\beta$ <sub>25-35</sub> do zastosowania w modelowaniu neurodegeneracji. W końcowej części wstępu Autorka dokonała selekcji i przeglądu obecnie dostępnych informacji na temat potencjału zastosowania wybranych trzech polifenoli w przeciwdziałaniu i leczeniu neurodegeneracji. Informacje naukowe zostały dobrze wyselekcjonowane i podane w odpowiedniej kolejności, a także poparte przemyślanymi schematami, stanowiąc właściwe wprowadzenie do części eksperymentalnej. Następujący dalej opis materiałów i metod zajmuje 19 stron. Warsztat metodyczny i układy doświadczalne opisano w sposób przejrzysty, a zarazem precyzyjny, umożliwiając nie tylko powtórzenie eksperymentów, ale też zrozumienie natury testów i ich doboru oraz etapów badań. Lwią część dysertacji stanowi opis wyników, które w syntetyczny sposób przedstawiono na 41 stronach głównej części pracy oraz na 45 stronach materiałów uzupełniających. Dyskusja zajmuje 23 strony. W rozdziale tym omówiono i uzasadniono wybór modelu komórkowego do badań, a także wybór zastosowanych układów doświadczalnych. Najbardziej znacząca część dyskusji obejmuje interpretację i analizę znaczenia rezultatów pracy w odniesieniu do mechanizmów molekularnych oddziaływania polifenoli i ich zestawów na komórki neuronalne oraz perspektyw dalszych badań w kierunku przeciwdziałania i terapii AD. Umiejętność prowadzenia takiej dyskusji jest ważnym kryterium dojrzałości naukowej.

Za rozdziałem *Dyskusja* zamieszczono klarownie i ostrożnie sformułowane wnioski. Spis literatury zawiera aż 282 pozycje, które starannie wyselekcjonowano, wybierając właściwe informacje. Następnie zamieszczono krótki spis stosowanych skrótów, spis tabel i rycin oraz materiały uzupełniające, które podzielono na trzy części, odpowiednio do trzech głównych ocenianych aspektów oddziaływania polifenoli na komórki. Pracę zamykają syntetyczne, 3-stronnicowe streszczenia w języku polskim oraz w języku angielskim. Dysertację uzupełniają dobrze dobrane i opracowane tabele w liczbie 22, jak też 14 schematów, 5 mikrografii i 16 rycin. Proporcja poszczególnych części pracy jest odpowiednia. Rozprawa ma niezwykle przejrzystą, przemyślaną konstrukcję i dostarcza wszystkich informacji, pozwalających na wysoką ocenę oryginalności i istotności rozwiązane problemu naukowego, ogólnej wiedzy doktorantki w uprawianej dziedzinie naukowej oraz Jej umiejętności prowadzenia badań naukowych i korzystania ze źródeł. Praca napisana jest w sposób zwięzły, z dyscypliną dla słowa pisanego, a zarazem zrozumiale i bardzo ciekawie. Zwraca też uwagę staranna forma edytorska. Autorka

posługuje się na ogół poprawnym, naukowym językiem. Z obowiązku recenzenta muszę zauważyć tylko kilka błędów. Wszystkie uwagi krytyczne przedstawiono poniżej.

### Uwagi krytyczne

1. We wstępie zatytułowanym „Choroba Alzheimera – wybrane zagadnienia” wskazane byłoby omówienie stadiów rozwoju AD, w tym zwłaszcza wczesnego, prodromalnego stadium AD u pacjentów z łagodnymi zaburzeniami poznawczymi (MCI). Autorka cytuje wyniki badań w grupie pacjentów z MCI, jednak należałoby stwierdzić, że jest to grupa niejednorodna, ponieważ nie u wszystkich pacjentów podłożem MCI jest choroba Alzheimera.
2. W podrozdziale „Patogeneza choroby Alzheimera” doktorantka stwierdza, że sformułowano trzy teorie wyjaśniające rozwój choroby. Po pierwsze, na obecnym etapie wiedzy należałoby raczej zastosować termin „hipotezy”, ponieważ nadal brak powszechnej zgody na temat przyczyn AD. Ponadto, poza hipotezą kaskady amyloidowej, hipotezą białka tau i hipotezą cholinergiczną, istnieje kilka innych hipotez zakładających bardziej pierwotne przyczyny AD, poprzedzające powstawanie toksycznych form amyloidu i spletków neurofibrilarnych. Należy tu wspomnieć o hipotezie wapniowej, hipotezie stresu oksydacyjnego i uszkodzeń mitochondrialnych oraz o hipotezie reaktywacji cyklu komórkowego w dojrzałych neuronach. Doktorantka opisuje procesy stresu oksydacyjnego i dysfunkcji mitochondriów oraz związane z tym zaburzenia szlaków sygnałowych komórki, ale raczej jako konsekwencje pojawienia się toksycznych oligomerów A $\beta$ , a nie przyczyny. Autorka wspomina jednak, że „Dysfunkcja mitochondriów generująca stres oksydacyjny i synaptotoksyczność są aktualnie uznawane za najwcześniejsze zdarzenia w patomechanizmie rozwoju neurodegeneracji w AD” (str. 11). Ponadto, na stronie 15 opisano wyniki wskazujące, że czynniki genotoksyczne mogą prowadzić do hiperacetylacji histonu H3 w regionie promotora genu BACE1, zwiększając jego ekspresję, a w konsekwencji prowadząc do wzrostu poziomu amyloidogennej proteolizy APP. Jest to zatem opis wskazujący na stres genotoksyczny jako pierwotny czynnik, poprzedzający powstawanie toksycznych form A $\beta$ . Powstaje zatem pytanie, która z hipotez, zdaniem Autorki, jest bardziej przekonująca w wyjaśnianiu pierwotnych przyczyn AD: hipoteza stresu oksydacyjnego i genotoksycznego czy hipoteza kaskady amyloidu?
3. Omawiając we wstępie molekularne podłoże rodzinnej formy AD Autorka w pierwszym rzędzie wymienia mutacje w obrębie trzech genów: APP, ApoE oraz IDE. Trudno z tym stwierdzeniem się zgodzić. Rodzinna forma AD związana jest z mutacjami autosomalnymi dominującymi w obrębie trzech genów, ale są to geny kodujące APP i białka PS1 i PS2 związane ze szlakiem amyloidogennej proteolizy APP, przy czym absolutna większość rodzinnych mutacji (ponad 200) występuje w genie PS1. W przypadku wielu innych genów ich związek z molekularnym podłożem AD wynika najczęściej z występujących w populacji polimorfizmów, nie mutacji. Wiele z takich genów wskazano w wyniku analizy typu *Genome Wide Association Study* (GWAS). W przypadku ApoE to nie mutacje, ale występujące izoformy decydują o zwiększeniu ryzyka AD (izoforma ApoE4) lub obniżeniu ryzyka (izoforma ApoE2).

4. Na stronie 22 dysertacji znajdujemy stwierdzenie, że A $\beta$  w pikomolowych stężeniach występuje również u osób bez zaburzeń poznawczych. To prawda, warto jednak byłoby w pełniejszy sposób przedstawić problem występowania także złogów A $\beta$  w mózgach osób bez demencji. Uważa się, że osoby te znajdują się w stadium przedobjawowym AD, w którym zwiększone jest ryzyko rozwoju tej choroby.
5. Wybór typu komórek do badań: w *Dyskusji* przedstawione zostały wady i zalety komórek linii PC12, różnicujących i upodabniających się pod wpływem NGF do neuronów dopaminergicznych śródmózgowia o zwiększonej wrażliwości na neuroprzebieżnik acetylocholinę. Zróżnicowane komórki PC12 nie są w istocie uznawane za dojrzałe neurony, ale są stosowane w wielu badaniach jako model neuronalny. Podstawowe wady tego modelu w odniesieniu do chorób neurodegeneracyjnych typowych dla człowieka to nowotworowe pochodzenie oraz kontekst genomu i proteomu szczura. Dyskusja wad i zalet tego modelu nie obejmuje możliwości zastosowania ludzkich komórek linii nerwiaka zarodkowego (*neuroblastoma*). Byłoby wskazane, aby autorka ustosunkowała się do tej możliwości.
6. W dyskusji dysertacji klarownie uzasadniono wybór peptydu A $\beta$ <sub>25-35</sub> jako czynnika neurotoksycznego wobec komórek PC12. Powstaje jednak pytanie, czy są znane i czy można porównać wyniki badania wybranych polifenoli w komórkach traktowanych peptydem A $\beta$ <sub>1-42</sub>?

#### Uwagi edycyjne i językowe

1. Lista skrótów stosowanych w pracy jest zbyt krótka i mało przydatna.
2. Częstym błędem językowym, którego nie uniknęła Autorka pracy, jest nierozróżnianie rzeczowników policzalnych i niepoliczalnych, np. str. 4 nie „ilość zachorowań” ale liczba zachorowań; str. 13, nie „ilość złogów”, ale liczba złogów; nie „ilość czynników”, ale liczba czynników; tytuł tabeli 2: nie „ilość wysiewanych komórek”, ale liczba komórek.
3. Autorka stosuje termin „rafty lipidowe”, który jest anglicyzmem. Prawidłowa nazwa w języku polskim to „tratwy lipidowe”.
4. Często w pracy występuje termin „cięcie APP” w odniesieniu do proteolizy APP. Jest to akceptowalne, ale właściwa terminologia to trawienie proteolityczne.
5. Str. 10 „...w hodowlach pierwszorzędowych...” – chodziło o hodowle pierwotne.
6. Str. 12: brak referencji dla stwierdzenia, że A $\beta$  może wiązać się z DNA.
7. Str. 15 „Na mysim modelu Alzheimera” - wypadło słowo „choroby”, prawidłowo powinno być „stosując mysi model choroby Alzheimera”.
8. Str. 15 „...wzrasta w płynie mózgowo-rdzeniowym poziom p-tau oraz następuje gromadzenie splątków neurofibrylarnych” – można błędnie zrozumieć, że gromadzenie splątków następuje w płynie mózgowo-rdzeniowym, a chodziło zapewne o mózg.
9. Na stronie 17 zamieszczono zdanie „...NF- $\kappa$ B indukuje transkrypcję licznych genów prozapalnych cytokin, m.in. iNOS, BACE1 i COX-2...”. To chyba skrót myślowy.
10. Str. 43 „doroste neurony” – powinno być „dojrzałe neurony”.

## Podsumowanie

Mimo kilku uwag krytycznych, których celem jest głównie zachęta do dalszej dyskusji, wysoko oceniam przedstawioną do oceny dysertację. Autorka podjęła się zadania znaczącego poznawczo i wymagającego metodycznie. Uzyskane wyniki mają w większości nowatorski, oryginalny charakter, a także walory aplikacyjne, stanowią bowiem wkład w rozwój farmakologicznych metod prewencji i leczenia choroby Alzheimerera. Lektura dysertacji nie pozostawia wątpliwości, że Pani mgr inż. Benita Wiatrak osiągnęła dużą sprawność eksperymentalną oraz zdobyła rozległą wiedzę i umiejętność krytycznej analizy danych, zatem wykazała dojrzałość umożliwiającą prowadzenie samodzielnych badań naukowych. Dysertacja wyróżnia się doskonałą organizacją materiału, precyzją opracowania i omówienia wyników oraz wnikliwością ich dyskusji. Stwierdzam, że rozprawa spełnia warunki określone w art. 13 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 pełnym przekonaniem wnioskuję zatem do Wysokiej Rady Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Analityki Medycznej Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie Pani mgr inż. Benity Wiatrak do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Prof. dr hab. Urszula Wojda