

Łódź, 26 05 2021r.

prof. dr hab. Agnieszka Piastowska-Ciesielska

Zakład Hodowli Komórkowych i Analiz Genomowych
Uniwersytet Medyczny w Łodzi
90-752 Łódź, ul. Żeligowskiego 7/9

RECENZJA

Rozprawy doktorskiej mgr Anny Rorbach-Dolaty pt. **„Badania modelowe szlaków ekscytotoksyczności w warunkach zaburzeń metabolizmu węglowodanów”**, wykonanej pod kierunkiem promotora prof. dr hab. Agnieszki Piwowar w Zakładzie Toksykologii, Wydziału Farmaceutycznego, Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu.

Podstawa formalna recenzji

Podstawę formalną opracowania recenzji stanowi uchwała Rady Dyscypliny Nauk Farmaceutycznych Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu nr 12/2021 z dnia 29 kwietnia 2021 roku.

Oryginalność, aktualność i przydatność podjętego problemu naukowego

Wzrost zapadalności osób z cukrzycą typu 2 (ang. *type 2 diabetes mellitus*; T2DM) na choroby neurodegeneracyjne, w tym chorobę Alzheimera, skłania do interdyscyplinarnych badań nad powiązaniem zaburzeń gospodarki węglowodanowej ze zmianami charakterystycznymi dla chorób neurodegeneracyjnych. Badanie te są istotne zarówno dla poznania mechanizmów jak również określenia potencjalnych wskaźników diagnostycznymi, czy też możliwościami prewencyjnymi. Z jednej strony tematyka ta jest bardzo ważna z uwagi na wysoką zachorowalność na cukrzycę, która została uznana za epidemię XXI, z drugiej zaś na fakt, że choroby neurodegeneracyjne cechuje brak możliwości regeneracji neuronów i ich



samopowielania, co czyni niemożliwym cofnięcie zmian które już powstały w obrębie centralnego układu nerwowego. O ważkości problemu świadczy również fakt, że wskazywany związek między występowaniem T2DM, towarzyszącej jej insulinooporności, a chorobą Alzheimera, zdefiniowano jako odrębne zaburzenie określane mianem cukrzycy typu 3 (ang. *type 3 diabetes mellitus*; T3DM). Coraz więcej uwagi poświęca się również procesowi ekscytotoksyczności indukowanej glutaminianem, któremu to przypisuje się rolę łącznika między przewlekłą hiperglikemią towarzyszącą cukrzycy typu 2, a patogenezą chorób neurodegeneracyjnych. Niezmiernie ważne jest zatem poznanie szlaków łączących te dwa procesy na poziomie komórkowym. Tym samym podjęta przez Doktorantkę tematyka badawcza jest bardzo istotna zarówno z poznawczego punktu widzenia jak również możliwości opracowania mechanizmów prewencyjnych czy też projektowani nowych leków.

Ogólna charakterystyka przedstawionej do recenzji rozprawy doktorskiej

Rozprawa doktorska przedstawiona do recenzji ma formę cyklu trzech publikacji (jednej przeglądowej i dwóch oryginalnych) opatrzonych obszernym komentarzem, o układzie redakcyjnym odpowiadającym wymogom stawianym pracom naukowym. Liczy ona 49 stron wydruku komputerowego (bez załączników - cyklu trzech publikacji), obejmującego 2 strony spisu treści, 15,5 strony wstępu, 1 stronę celów badań, 3 strony materiałów i metod, 4 strony wyników i ich omówienie w odniesieniu do cyklu publikacji, 1 stronę wniosków, 7 stron streszczenia pracy w języku polskim i angielskim, 7 stron piśmiennictwa oraz 45 stron obejmujących spis rycin, źródło finansowania, wykaz stosowanych skrótów, spis załączników publikacje stanowiące cykl prac, dane bibliometryczne oraz oświadczenia współautorów.

Ocena przedstawionego do recenzji manuskryptu

Recenzowanie doktoratów powstających w oparciu o cykl publikacji jest zadaniem szczególnym, gdyż recenzent analizuje prace poddane już wcześniej krytycznej ocenie na poziomie Redakcji czasopism i powołanych przez nie recenzentów. Tym samym możemy oczekiwać, że merytoryczna jakość ocenianych prac została już potwierdzona, niemniej jednak, recenzent nadal może znaleźć kilka punktów do dyskusji z Doktorantką.

W swoich badania Doktorantka wykorzystywała linię komórkową PC12, która hodowana była w pożywce RPMI 1640. Moje pytanie dotyczy następującej kwestii – czy do przygotowania



pożywki doświadczalnej doktorantka używała tego samego RPMI 1640 czy też zdecydowała się na wariant żywki bez glukozy?

W sekcji *Cell count and viability* obu prac oryginalnych Doktorantka wskazała, że wykorzystywał urządzenie Juli FL (fluorescencyjny system do obserwacji komórek) do oszacowania konfluencji hodowli komórkowej bezpośrednio w naczyniach hodowlanych – proszę o wyjaśnienie dlaczego taka metoda jest efektywniejsza od standardowo wykorzystywanych mikroskopów, jakie korzyści odniosła Doktorantka stosując ten system i w jakim zakresie wykorzystywana była fluorescencja.

W rozdziale *Metody zastosowane w badaniach* Doktorantka napisał „Komórki PC12 osadzono na 96-dolkowej płytce w ilości 1.8×10^5 na dołek, a następnie inkubowano przez 48 godzin z różnymi stężeniami glukozy” czy rzeczywiście komórki były nanoszone na dolki w żywkach doświadczalnych, gdyż jednocześnie Doktorantka wskazuje „Po 24 h medium zmieniono, a po 48h inkubacji żywkę usunięto i przeprowadzono test MTT oparty o wykorzystanie soli tetrazolowych w celu oceny żywotności komórek.”

W obu pracach oryginalnych Doktorantka podała, że insulina była rozpuszczana w żywce RPMI 1640 i podawana bezpośrednio do dołków. W jakiej objętości podawano insulinę do dołków płytki 96-dolkowej?

Doktorantka do oceny żywotność komórek wykorzystwała test MTT. W sekcjach *MTT Assay* i *Colorimetric cell viability (MTT) assay* prac oryginalnych opisała, że po upływie czasu inkubacji z badanymi związkami usuwała żywkę i nanosiła na każdy z dołków 100µl 0,6mg/ml MTT (czas inkubacji 3h). W czym rozpuszczone było MTT i czy użyty rozpuszczalnik mógł wpływać na żywotność komórek?

Podsumowując, tworzące cykl prace napisane są w sposób czytelny a koncepcja i sposób zaprojektowania badań, oraz ocena uzyskanych wyników nie budzą wątpliwości. Bardzo wysoko oceniam sposób przedyskutowania uzyskanych wyników na tle szeroko przytaczanego piśmiennictwa. Doktorantka jasno pokazuje w Dyskusji elementy nowatorskiego podejścia do rozwiązywanego problemu naukowego jak również wskazuje dalsze kierunki badań. Przedstawione wnioski są dobrze skonstruowane i oparte o uzyskane wyniki badań.



Podsumowanie i wnioski końcowe

Przedstawiona do recenzji rozprawa stoi na bardzo wysokim poziomie naukowym. Uzyskane wyniki stanowią cenny wkład do dotychczasowej wiedzy na temat mechanizmów łączących hiperglikemię, hiperinsulinemię z neurodegeneracją. Doktorantka wykazała dobre opanowanie warsztatu badawczego i dużą sprawność w prowadzeniu badań i interpretacji rzetelnie udokumentowanych wyników. Zastosowane metody badawcze odpowiadają standardom w tego typu badaniach i nie budzą zastrzeżeń.

Stwierdzam, że rozprawa spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim określone w art. 13 ust. 1 z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595, z późniejszymi zmianami), jak również w §6 ust. 3 Rozporządzenia Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 19 stycznia 2018 roku (Dz. U. z 2017 r. poz. 1789). **W związku z powyższym mam zaszczyt przedłożyć wniosek o dopuszczenie Pani mgr Anny Rorbach-Dolaty do dalszych etapów przewodu doktorskiego.** Jednocześnie wskazując na wysoką wartość merytoryczną uzyskanych wyników o wysoką aktywność publikacyjną Doktorantki składam wniosek o wyróżnienie rozprawy.

KIEROWNIK

Zakładu Hodowli Komórkowych i Analiz Genomowych
Uniwersytet Medyczny w Łodzi

Agnieszka Piastowska-Ciesielska
prof. dr hab. Agnieszka Piastowska-Ciesielska