

**Recenzja rozprawy doktorskiej
p.t.: „Badania modelowe szlaków ekscytotoksyczności
w warunkach zaburzeń metabolizmu węglowodanów”,
wykonanej przez mgr Annę Rorbach-Dolatę,
pod kierunkiem Pani Prof. dr hab. Agnieszki Piwowar,
w Katedrze i Zakładzie Toksykologii,
Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu**

Śląski Uniwersytet
Medyczny w Katowicach

Katedra i Zakład Chemii
Klinicznej i Diagnostyki
Laboratoryjnej

41-200 Sosnowiec
ul. Jedności 8
www.chemklin.sum.edu.pl

KIEROWNIK KATEDRY
prof. dr hab. n. med. i n. o zdr.
Katarzyna Komosińska-Vashev
kvassev@sum.edu.pl

SEKRETARIAT
tel.: (+48 32) 364 11 50
fax: (+48 32) 364 11 57
chem_klin@sum.edu.pl



Zarówno cukrzyca jak i choroby neurodegeneracyjne są szczególnie doniosłym wyzwaniem dla medycyny, zważywszy iż z powodu szacowanej coraz dłuższej przeżywalności w ogólnej populacji, narasta problem schorzeń związanych ze starszym wiekiem, włączając chorobę Alzheimera czy cukrzycę. Dotychczasowe badania wskazują na znaczne nakładanie się czynników ryzyka, chorób współistniejących i przypuszczalnych mechanizmów patofizjologicznych choroby Alzheimera i łagodnych zaburzeń funkcji poznawczych oraz cukrzycy typu 2 (T2DM) – schorzeń, których rozpowszechnienie osiągnęło (w przypadku cukrzycy), lub zaczyna osiągać (zespoły otępienne) rozmiary globalnej epidemii.

Czynnikiem łączącym cukrzycę typu 2 z chorobą Alzheimera jest insulinooporność. Zjawisko narastania insulinooporności postępuje wraz z wiekiem. Insulinooporność od dawna uznawana jest za główną cechę T2DM, często wyprzedzającą wystąpienie choroby o wiele lat. Z kolei insulinooporność mózgu – definiowana jako niewydolność komórek mózgowych w odpowiedzi na insulinę – sprzyja wystąpieniu procesów neurodegeneracyjnych. Insulinooporność mózgowa może wynikać ze zmniejszenia ilości receptorów insuliny zlokalizowanych w różnych regionach mózgu, upośledzonej funkcji tych receptorów w zakresie wiązania insuliny lub nieprawidłowej aktywacji kaskady sygnalizacyjnej insuliny. Na poziomie komórkowym dysfunkcja ta może objawiać się osłabieniem neuroplastyczności, regulacją uwalniania neuroprzekaźników w neuronach lub upośledzeniem procesów bardziej bezpośrednio związanych z metabolizmem insuliny, takich jak wychwyty glukozy przez komórki nerwowe.

Badania naukowe wskazują, że insulinooporność ośrodkowego układu nerwowego związana jest ponadto ze zwiększoną akumulacją beta amyloidu oraz białka tau w komórkach nerwowych, odgrywając istotną rolę w mechanizmie patogenetycznym rozwoju choroby Alzheimera. Istotną rolę łącznika między przewlekłą hiperglikemią towarzyszącą cukrzycy typu 2, a patogenezą chorób neurodegeneracyjnych, przypisuje się ponadto procesowi ekscytotoksyczności indukowanej glutaminianem.

Stąd też przedstawione wyżej wzajemne powiązania pomiędzy cukrzycą typu 2 wraz z towarzyszącą jej insulinoopornością, a występowaniem chorób neurodegeneracyjnych, w pełni uzasadniają celowość podjętych badań

Zważywszy ponadto, iż mechanizmy powstawania insulinooporności w warunkach współistnienia zaburzeń gospodarki węglowodanowej i procesów neurodegeneracyjnych, jak również powiązanie sygnalizacji insulinowej z glutaminergiczną - wciąż nie są do końca poznane, praca doktorska pt. „Badania modelowe szlaków ekscytotoksyczności w warunkach zaburzeń metabolizmu węglowodanów”, porusza zasadną i wpisującą się w aktualne trendy badawcze tematykę.

Przedstawiona do recenzji praca doktorska została przygotowana w formie podsumowującego omówienia cyklu 3 monotematycznych publikacji, z których dwie mają charakter prac oryginalnych, zaś jedna – jest pracą poglądową, stanowiącą cenne wprowadzenie w realizowaną tematykę badawczą.

1. Rorbach-Dolata A, Piwowar A. Neurometabolic evidence supporting the hypothesis of increased incidence of type 3 diabetes mellitus in the 21st Century. *Biomed Res Int.* 2019, Vol.2019 art. 1435276 [8s.], **IF=2.276**
2. Rorbach-Dolata A., Kicinska A, Piwowar A. The dephosphorylation of p70S6 (Thr389) kinase as a marker of l-glutamate-induced excitotoxicity related to diabetes disturbances - an unconventional in vitro model, *Neurotox. Res.* 2020, vol.37, no.3, 628-639, **IF = 2.992**
3. Rorbach-Dolata A., Piwowar A. Extracellular signal-regulated kinases, P38 and c-Jun N-terminal kinases phosphorylation changes in PC12 cells with diabetic disturbances and comorbid excitotoxicity - a preliminary report, *J. Physiol. Pharmacol.* 2020, vol.71, no.5, 625-633, **IF = 2.624**

Sumaryczny wskaźnik oddziaływania IF dla cyklu prac wynosi **7.892**. Prace mają charakter opracowań wieloautorskich (2 lub 3 autorów). We wszystkich pracach Doktorantka jest pierwszym autorem, a dołączone oświadczenia współautorów wskazują na wiodącą rolę Doktorantki w powstaniu publikacji, przedłożonych jako rozprawa doktorska. Deklarowany procentowy udział mgr Anny Rorbach-Dolaty w opracowaniu publikacji wynosił bowiem 65% w przypadku pracy poglądowej, oraz 75% i 80% w przypadku prac oryginalnych.

Łączny dotychczasowy dorobek naukowy mgr Anny Rorbach-Dolaty, z wyłączeniem cyklu 3 prac włączonych, obejmuje 7 prac opublikowanych w czasopiśmie z IF o sumarycznej wartości IF = 18.558 i 430 punktów MNiSW., 11 prac bez IF (110 punktów MNiSW) oraz 29 streszczeń zjazdowych. Jest to wynik wskazujący iż Doktorantka ma osiągnięcia publikacyjne i doświadczenie badawcze, będąc członkiem dobrze zorganizowanego i posiadającego duże osiągnięcia naukowe – zespołu badawczego.

Przedłożona do oceny praca liczy 95 stron, obejmując spis treści, streszczenie w języku polskim i angielskim, wstęp oraz rozdziały stanowiące wprowadzenie do podjętej tematyki badań, cel pracy, materiały i metody, listę publikacji stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej wraz z omówieniem uzyskanych wyników oraz pełnymi tekstami przedmiotowych publikacji, zestawienie całościowego

dorobku Doktorantki sporządzone przez Dział Informatyki Naukowej i Bibliografii Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu oraz oświadczenia współautorów prac. Istnieje rozbieżność w ilości punktów IF, które dla pracy nr 3 z cyklu stanowiącego podstawę rozprawy doktorskiej, zostały przypisane przez Doktorantkę (na str.72 – pocano IF dla tej pracy 2.644), z ilością punktów IF dla tego opracowania, przedstawionych w wykazie otrzymanym z Biblioteki Głównej Uczelni.

Wstęp rozprawy doktorskiej stanowi publikacja pogładowa, której zawartość Autorka podsumowała jako ogólne wprowadzenie w realizowaną tematykę, opisując teoretyczne podstawy procesu ekscytotoksyczności zależnej od glutaminianu wraz z mechanizmami zaburzeń metabolicznych związanych z cukrzycą. Ta część stanowi wartościowe opracowanie, przydatne w lekturze dalszych części rozprawy, uzasadniając zarazem wyjaśnienie celowości podjęcia się przedstawionych badań.

Zasadną i wpisującą się w aktualne trendy badawcze jest – podjęta przez Doktorantkę – próba analizy oceny szlaków sygnałowych istotnych dla zaburzeń gospodarki węglowodanowej i towarzyszącej ekscytotoksyczności. W tym celu Doktorantka dokonała oceny stopnia fosforylacji reszt aminokwasowych wybranych białek, takich jak: izomery pozakomórkowej kinazy regulowanej sygnałem $\frac{1}{2}$ (ERK $\frac{1}{2}$), izomery kinazy białkowej B, białko p70S6K, czynnik transkrypcyjny CREB, β -katenina, białko p38 oraz izomery kinazy N-końcowej kinazy białka c-Jun $\frac{1}{2}$ (JNK) – uczestniczących w przekazywaniu sygnałów w warunkach ekscytotoksyczności indukowanej glutaminianem, przy współistnieniu hiperglikemii oraz hiperinsulinemii.

Badania przeprowadziła Doktorantka na niezróżnicowanej linii komórkowej PC12, pochodzącej z guza chromochłonnego rdzenia nadnerczy szczura, powszechnie stosowanej w badaniach modelowych szlaków sygnałowych na poziomie komórkowym. Przedmiotem badań była ocena wpływu glukozy (G), insuliny (I) i L-glutaminian (L) jako substancji mających znaczenie w zaburzeniach charakterystycznych dla chorób neurodegeneracyjnych związanych z zaburzeniami gospodarki węglowodanowej, na komórki PC12 po 48 h ekspozycji. Każdą z substancji badano w dwóch różnych stężeniach (G1 i G2, I1 i I2, L1 i L2). Oceny żywotności komórek oraz stopnia fosforylacji wybranych białek uczestniczących w szlakach sygnałowych w procesie ekscytotoksyczności, hiperglikemii oraz hiperinsulinemii dokonano w układach jedno-, dwu- i trzyczynnikowych badanych substancji poprzez zastosowanie adekwatnych testów.

Przeprowadzone badania ujawniły złożoność wzajemnych powiązań pomiędzy wpływem poszczególnych substancji (glukoza, insulina, L-glutaminian) oddziaływujących z osobna, jak i w układach dwu i trójskładowych – na żywotność populacji komórek PC12 i stopień fosforylacji wybranych białek.

Nowatorski aspekt pracy podkreślają uzyskane po raz pierwszy wyniki wskazujące na defosforylację białka p70s6k przy jednoczesnym wzroście fosforylacji β -kateniny, CREB, p38 oraz JNK w przypadku jednoczesnej ekspozycji na wyższe stężenie glukozy, niższe stężenie insuliny oraz wyższe stężenie L-glutaminianu, co wskazuje na ich istotną

rolę w zaburzeniach charakterystycznych dla chorób neurodegeneracyjnych przebiegających z zaburzeniami gospodarki węglowodanowej.

Jednocześnie dowiedziono, że inkubacja komórek PC12 z wyższym stężeniem L-glutaminianu w połączeniu z glukozą (w obu stężeniach) - lub jednocześnie z glukozą oraz insuliną, powodowała defosforylację białka p70s6k, wskazując z dużym prawdopodobieństwem na kluczowy udział tego białka w modyfikacji szlaków sygnałowych w warunkach ekscytotoksyczności oraz towarzyszących zaburzeń gospodarki węglowodanowej.

Podsumowując, w ramach przedłożonej pracy doktorskiej, Autorka podjęła się realizacji istotnych badań zmierzających do wyjaśnienia mechanizmów molekularnych współistnienia zaburzeń charakterystycznych dla chorób neurodegeneracyjnych z zaburzeniami gospodarki węglowodanowej, otwierając drogę do poszukiwań nowych markerów diagnostycznych i prognostycznych, czy też punktów uchwytu nowych strategii terapeutycznych, w ramach profilaktyki i/lub leczenia chorób neurodegeneracyjnych związanych z zaburzeniami gospodarki węglowodanowej.

Z obowiązku recenzenta chciałabym zwrócić uwagę na fakt, iż w doświadczalnym modelu badawczym wielopłaszczyznowej analizy szlaków sygnałowych ekscytotoksyczności związanej z zaburzeniami gospodarki węglowodanowej, do tych ostatnich włączono oprócz hiperglikemii, również hiperinsulinemię. Zastosowany model komórkowy, oparty o warunki przewlekłej hiperglikemii, hiperinsulinemii oraz ekscytotoksyczności, stworzono w założeniu jako odzwierciedlający warunki zaburzeń charakterystycznych dla neurodegeneracji, wynikającej z zaburzeń metabolizmu węglowodanów (tzw. cukrzyca typu 3). Jak podkreśla Doktorantka w streszczeniu pracy nr 3 oraz na stronie 26 komentarza do prac, uzyskane wyniki badań reprezentują cenne narzędzie poznawcze dla badań nad zaburzeniami neurodegeneracyjnymi, wynikającymi z długotrwałej cukrzycy typu 2. Tymczasem w długotrwałej cukrzycy, jaka zwykle występuje u osób w wieku podeszłym z zaburzeniami funkcji poznawczych, zdolność wydzielnicza komórek β wyczerpuje się, chorzy często wymagają leczenia insuliną. Tak zatem warunek hiperinsulinemii, jaki zastosowała Doktorantka w swoim modelu badawczym odzwierciedla raczej wczesne zaburzenia gospodarki węglowodanowej u osób w wieku podeszłym, choć jak wynika z literatury również one mogą być powiązane z zaburzeniami funkcji poznawczych i chorobą Alzheimera. Przedstawiona uwaga ma charakter uzupełniający. Nieliczne uwagi dotyczą ponadto następujących zagadnień:

- str.20, linia 9 od góry: zgodnie z nazewnictwem stanów hiperglikemicznych według Światowej Organizacji Zdrowia, zawartym w dokumencie: *Zalecenia kliniczne dotyczące postępowania u chorych na cukrzycę 2020 – Stanowisko Polskiego Towarzystwa Diabetologicznego - IFG, impaired fasting glucose*, określamy jako nieprawidłową glikemię na czczo

- str 20, linia 21 od góry, zamiast słowa „trójglicerydów” powinna Doktorantka użyć określenia „triacylgliceroli”



Śląski Uniwersytet
Medyczny w Katowicach

W podsumowaniu stwierdzam, iż przedłożona do oceny rozprawa doktorska praca jest osiągnięciem wartościowym i oryginalnym. Dzięki lepszemu zrozumieniu mechanizmów molekularnych, wywołujących i/lub towarzyszących chorobom neurodegeneracyjnym można opracować nowe metody wykrywania, kontroli i eliminacji czynników ryzyka. W oparciu o nowatorskie i skuteczne narzędzia być może uda się prowadzić spersonalizowaną diagnostykę i leczenie tych chorób.

Z pełnym zatem przekonaniem stwierdzam, iż rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art.13 ust.1 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. (Ustawa o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. z 2017 r. poz. 1789 z późn. zm.) i wnoszę do Rady Dyscypliny Nauki Farmaceutycznej Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu o dopuszczenie Pani mgr Anny Rorbach-Dolaty do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

KIEROWNIK
Katedry i Zakładu Chemii Klinicznej
i Diagnostyki Laboratoryjnej
Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach
K. Komosińska-Vassev
prof. dr hab. n. med. i n. o zdrowiu
Katarzyna Komosińska-Vassev

Sosnowiec, 27.05.2021