

Warszawa, dn. 1 sierpnia 2023 r.

Dr hab. Piotr Bednarczyk, prof. SGGW
Katedra Fizyki i Biofizyki
Instytut Biologii/SGGW
ul. Nowoursynowska 159, bud. 34, pok. 74
02-776 Warszawa

RECENZJA

rozprawy doktorskiej Pani mgr Karoliny PIECYK
pt. „MECHANIZMY ADAPTACJI MITOCHONDRIÓW W
PIERWOTNYCH FIBROBLASTACH LUDZKICH WE
WCZESNYCH ETAPACH STARZENIA; EFEKT DAIDZEINY”

wykonanej pod kierunkiem prof. dr hab. Joanny
Szczepanowskiej i prof. dr hab. Pawła J. Kuleszy

w Pracowni Metabolizmu Komórki Instytutu Biologii
Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN oraz w Pracowni
Elektroanalizy i Elektrokatalizy Chemicznej Wydziału Chemii
Uniwersytetu Warszawskiego

Szkoła Główna
Gospodarstwa
Wiejskiego w Warszawie

Instytut Biologii
Katedra Fizyki i Biofizyki

ul. Nowoursynowska 159
02-776 Warszawa
+48 22 59 386 20

piotr_bednarczyk@
sggw.edu.pl
kfb@sggw.edu.pl
www.sggw.edu.pl
www.kf.sggw.pl

W rozprawie doktorskiej wykorzystano pierwotne fibroblasty ludzkie do oceny odpowiedzi mitochondriów na stres związany z wczesnymi etapami starzenia komórkowego. Zastosowano dwa modele odzwierciedlające różne mechanizmy starzenia. Model 1: starzenie replikacyjne, związane ze skracaniem telomerów. Były to fibroblasty pochodzące z późniejszych etapów hodowli, które reprezentowały długotrwałe lecz łagodny stres komórkowy. Model 2: starzenie indukowane stresem oksydacyjnym. Tutaj zastosowano wodoronadletnek t-butylu, który był egzogennym źródłem reaktywnych form tlenu indukujący w ten sposób krótkotrwałe, lecz silny stres komórkowy.

W powyższych modelach scharakteryzowano funkcje mitochondriów oraz elementy odpowiedzi komórkowej na stres mitochondrialny. Badania te wykazały, że wspólną cechą obu modeli starzenia komórkowego jest podniesiony poziom reaktywnych form tlenu, wzrost uszkodzeń oksydacyjnych białek oraz aktywacja procesu autofagii/mitofagii. W silnym, lecz krótkotrwałym stresie oksydacyjnym nie zaobserwowano wyraźnych zmian odpowiedzi związanej z adaptacją mitochondriów do stresu. Natomiast w modelu starzenia replikacyjnego zaobserwowano adaptację mitochondriów poprzez reorganizację sieci mitochondrialnej. Dodatkowo, w komórkach „starych” z pasażu 52-53 zaobserwowano znacznie większą liczbę komórek SA- β -GAL pozytywnych w porównaniu do komórek z pasażu 18-25.

Kolejnym elementem pracy było zbadanie wpływu daidzeiny, którą podejrzewa się o „dobroczynne” działanie na funkcjonowanie mitochondriów w procesie starzenia. Jednak, zaobserwowano zróżnicowane efekty działania daidzeiny w zależności od wykorzystanego modelu:

- w komórkach młodych, daidzeina wykazywała działanie prooksydacyjne, widoczne jako podniesienie poziomu nadtlenu wodoru oraz uszkodzeń oksydacyjnych białek,
- w komórkach z „przyspieszonym starzeniem”, daidzeina wykazywała właściwości antyoksydacyjne, co zostało zaobserwowane poprzez zmniejszony poziom reaktywnych form tlenu oraz zmniejszony poziom uszkodzeń oksydacyjnych białek,
- w modelu komórek reprezentujących starzenie replikacyjne, daidzeina wykazywała właściwości antyoksydacyjne, co zostało wykazane poprzez zmniejszony poziom reaktywnych form tlenu, niższy poziom uszkodzeń oksydacyjnych białek oraz modyfikacje sieci mitochondrialnej.

Dodatkowo porównano działanie daidzeiny z daidzeiną skoniugowaną z kationem TPP⁺. Tutaj, badania wykazały, że daidzeina TPP⁺ obniża poziom nadtlenu wodoru w obu typach starzenia. Natomiast w komórkach „młodych” oraz „starych” z pasażu 52-53 podnosi poziom nadtlenu wodoru. Ponadto, daidzeina TPP⁺ zwiększa cytozolowy poziom wapnia w komórkach młodych oraz starzejących się replikacyjnie. W badaniach potwierdzono również, że zastosowanie koniugatu daidzeiny nie prowadzi do depolaryzacji mitochondriów, zatem bioenergetyka mitochondriów nie jest zaburzona.

Przedstawiona do recenzji rozprawa stanowi monografię opracowaną zgodnie z zasadami przyjętymi dla prac doświadczalnych w zakresie nauk biologicznych. Zawiera 149 stron i klasyczny podział na: Spis treści, Wykaz skrótów, Streszczenie w języku polskim i angielskim, Wstęp, Cel pracy, Materiały i Metody, Wyniki, Dyskusję, Podsumowanie i Wnioski, Bibliografię oraz Listę publikacji naukowych doktorantki.

Tematyka badawcza, bez wątpienia, podejmuje aktualne trendy badawcze. Ponad połowa (130 z 202) wszystkich cytowani stanowią publikacje z ostatnich 10 lat.

Rozprawa doktorska powstała dzięki finansowaniu interdyscyplinarnych studiów doktoranckich TRI-BIO-CHEM jako projektu "Od chemii do bioinnowacji dla lepszego życia - interdyscyplinarne studia doktoranckie TRI-BIO-CHEM" realizowanego przez trzy jednostki partnerskie (Wydział Chemii Uniwersytetu Warszawskiego, Wydział Chemiczny Politechniki Warszawskiej, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego) w ramach Projektu Operacyjnego Wiedza Edukacja Rozwój 2014-2020 i współfinansowanego ze środków Europejskiego Funduszu Społecznego, POWR.03.02.00-00-I007/16-00 (POWER 2014-2020).

Tytuł rozprawy doktorskiej jest sformułowany poprawnie i w pełni odzwierciedla cel badań przeprowadzonych przez doktorantkę.

We wstępie teoretycznym doktorantka w pięciu podrozdziałach przedstawia podstawy budowy i funkcji mitochondriów, podejmuje się opisu dynamicznej natury mitochondriów, określa przyczyny i konsekwencje zaburzenia funkcjonowania mitochondriów, wprowadza czytelnika w zagadnienia adaptacji funkcji mitochondriów do zmienionych warunków oraz systematycznie charakteryzuje fitoestrogeny, w tym daidzeinę – substancję, którą wykorzystywała w przeprowadzonych badaniach. Warto podkreślić, że ten rozdział jest bogaty w ilustracje co daje możliwość obrazowego śledzenia wprowadzanego materiału. Część rycin została przygotowana przez doktorantkę, a inne są modyfikacją już istniejących w opracowaniach.

Wstęp do rozprawy doktorskiej został napisany poprawnie zarówno pod względem merytorycznym jak i językowym. Jego forma i treść świadczą o dobrym przygotowaniu teoretycznym doktorantki do realizacji postawionych celów rozprawy doktorskiej.

Cel rozprawy doktorskiej zawarty został na stronie 35 i dotyczy zbadania, jak mitochondria adaptują się na drodze wstecznej kaskady sygnałowej we wczesnym okresie starzenia indukowanego i replikacyjnego, w pierwotnych fibroblastach oraz zbadanie wpływu fitoestrogenu – daidzeiny na te procesy. Dodatkowo, do realizacji celu, doktorantka wytyczyła zadania badawcze co w klarowny sposób przedstawia zarys rozprawy doktorskiej. Na uznanie zasługuje przygotowanie graficznej postaci celu pracy, jednak wielkość czcionki tekstu utrudnia swobodne zrozumienie grafiki.

Rozdział 3. Materiały i Metody zawierają szczegółowy opis wykorzystanych związków chemicznych i materiałów, modelowych linii komórkowych oraz technik doświadczalnych. Bardzo przydatne jest zamieszczenie, w tych rozdziałach, tabel i schematów, które ułatwiają zrozumienie wykonanych doświadczeń.

Starannie zaplanowane doświadczenia zostały przeprowadzone z wykorzystaniem wielu technik biochemicznych, biologii molekularnej czy elektrochemicznych. Doktorantka

wykorzystała metody do oceny proliferacji komórek czy oznaczeń masy mitochondrialnej. Zastosowała techniki pomiaru potencjału wewnętrznej błony mitochondrialnej, oraz cytosolowego poziomu wapnia. Oznaczyła poziom reaktywnych form tlenu analizując dane z wykorzystaniem laserowego cytometru skaningowego. Wykonała testy wbudowywania BrdU, karbonylacji białek (OXYBLOT) oraz oznaczyła aktywności SA- β – galaktozydazy związanej ze starzeniem. Przeprowadziła analizę morfologii sieci mitochondrialnej z wykorzystaniem barwień i mikroskopii konfokalnej. Badała szybkości odnowy mitochondriów i oznaczała względne ilości białek metodą Western blot. W ostatnim etapie pracy została zaplanowana i wykorzystana metoda woltamperometrii cyklicznej.

Przedstawiony opis metodologii i technik wskazuje na bogaty warsztat badawczy doktorantki. Dodatkowo, na uznanie zasługuje zastosowanie woltamperometrii cyklicznej, zaawansowanej techniki do badania reakcji elektrochemicznych. Wszystko to, świadczy o znakomitym przygotowaniu merytorycznym jaki i technicznym doktorantki do realizacji postawionych celów rozprawy.

W rozdziale 4. Wyniki, Pani mgr Karolina Piecyk przedstawiła oraz udokumentowała otrzymane wyniki w formie opisowej oraz graficznej. Rozdział ten zawiera ryciny (56) które przedstawiają wykresy i zdjęcia. Dodatkowo, rozdział ten został podzielony na dwie części z podsumowaniem w formie tabeli. Tak zorganizowany rozdział ułatwia usystematyzowanie oraz zrozumienie otrzymanych wyników.

Na potrzeby realizacji celów badawczych doktorantka w pierwszym etapie wyników dokonuje doboru odpowiedniego modelu doświadczalnego a następnie charakteryzuje badane linie komórkowe przez ocenę proliferacji, intensywności podziałów komórkowych oraz liczby komórek o podwyższonym poziomie SA- β -GAL w populacji. Przeprowadza charakterystykę fizjologii mitochondriów na podstawie pomiaru potencjału wewnętrznej błony mitochondrialnej, poziomu wapnia w komórce czy poziomu reaktywnych form tlenu. Ocenia poziom enzymów antyoksydacyjnych oraz uszkodzeń oksydacyjnych białek. Przeprowadza badania morfologii komórki, sieci i architektury mitochondrialnej. Następnie badany jest poziom białek zaangażowanych w proces biogenezy oraz autofagia/mitofagia. W drugiej części zawarte są wyniki dotyczące efektu daidzeiny na powyższe parametry włączając dodatkowo charakterystykę elektrochemiczną i ocenę stosowanego stężenia daidzeiny.

Wyniki zostały przedstawione jako średnie arytmetyczne z odchyleniem standardowym, uzyskane z co najmniej trzech niezależnych doświadczeń. Różnice uznano za istotne statystycznie dla poziomu $p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$.

W rozdziale 5. Dyskusja doktorantka uzasadniła dobór modelu badawczego oraz skomentowała poszczególne obszary badań i uzyskane wyniki. Dyskusja została przeprowadzona w oparciu o dane już opublikowane. Taka forma świadczy o

wszechstronnej znajomości tematu oraz dobrym przygotowaniu merytorycznym doktorantki. Doktorantka konsekwentnie stosuje w tekście określone formatowanie cytowań co ułatwia poruszanie się po liście bibliografii.

Rozprawa doktorska kończy się wnioskami, które korelują uzyskane wyniki z postawionym celem badawczym oraz wskazują na oryginalne rozwiązanie problemu naukowego.

Pod kątem merytorycznym, przedstawiona rozprawa doktorska zasługuje na wysoką ocenę, jednak chciałbym zwrócić uwagę na pewne ogólne zastrzeżenia czy nie zaspokoją ciekawość:

1. Jaki był powód wykorzystania w modelu indukowanego stresu wodoronadtlenku tert-butyłu a nie nadtlenu wodoru?
2. Do oceny potencjału wewnętrznej bony mitochondrialnej została wykorzystana sonda JC-1. Poziom jonów Ca^{2+} w cytoplazmie oznaczony został z wykorzystaniem sondy Fluo4-AM. Poziom anionorodnika ponadtlenu w mitochondriach oznaczono z wykorzystaniem sondy MitoSOX a poziom nadtlenu wodoru w cytoplazmie oznaczony został z wykorzystaniem sondy CM-H2DCFDA. Co było powodem, że w tych czterech przypadkach największe odchylenia standardowe były w przypadku pomiarów dla komórek z pasażu 52-53 (Ryc. 4.4, 4.5, 4.6A i 4.6B odpowiednio)?
3. Aby zbadać właściwości antyoksydacyjne daidzeiny wykorzystano technikę woltamperometrii cyklicznej. W tych doświadczeniach jest wykorzystywany protokół z zakresem potencjałów od 0,6 do -0,6 V, natomiast w modelach komórkowych maksymalne wartości potencjałów utrzymywanych w poprzek błon biologicznych są rzędu 200 mV. Zatem jak uzasadnić tak szeroki zakres stosowanych potencjałów?
4. Jedno ze sformułowań zawartych w Rozdziale 6. PODSUMOWANIE I WNIOSKI stanowi, że „zastosowanie daidzeiny z TPP^+ (w wybranych stężeniach) nie prowadzi do depolaryzacji mitochondriów”. Zatem wydaje się, że dołączenie TPP^+ do daidzeiny nie jest skutecznym zabiegiem kierowania takiego koniugatu do mitochondriów?

Pojawiły się również dość nie precyzyjne sformułowania, które z pewnością stanowiły by niejasność dla rozpoczynających karierę naukowców, np.: „jonomycyną, czyli jonoforem wapniowym powodującym wyraźny wzrost cytosolowego poziomu jonów Ca^{2+} ” (str. 41), „TBH potrafi wywołać stres oksydacyjny” (str. 58), „egzodenny dawca RTF” (str. 58).

Wymienione powyżej uwagi nie wpływają na wysoką ocenę wartości merytorycznej rozprawy. Pragnę podkreślić, że Pani mgr Karolina Piecyk znakomicie wywiązała się z postawionych zadań z wykorzystaniem szerokiego spektrum technik i metod biochemicznych, biologii molekularnej czy elektrochemicznych. Wydaje się, że praca

wypełnia lukę badawczą a podjęta tematyka jest aktualna i ma potencjał publikacyjny czy aplikacyjny.

Stwierdzam z całym przekonaniem, że rozprawa doktorska Pani mgr Karoliny Piecyk pt. „MECHANIZMY ADAPTACJI MITOCHONDRIÓW W PIERWOTNYCH FIBROBLASTACH LUDZKICH WE WCZESNYCH ETAPACH STARZENIA; EFEKT DAIDZEINY” spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478, 619, 1630). Zatem zwracam się do Rady Naukowej Instytutu Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego, Polskiej Akademii Nauk z wnioskiem o dopuszczenie Pani mgr Karoliny Piecyk do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Z uwagi na oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, znaczącą wartość naukową otrzymanych wyników, wyjątkową staranność w opracowaniu oraz przedstawieniu tak dużego materiału badawczego wnoszę o wyróżnienie przedstawionej do oceny rozprawy doktorskiej.



Dr hab. Piotr Bednarczyk, prof. SGGW

Prof. dr hab. Wiesława Jarmuszkiewicz
Instytut Biologii Molekularnej i Biotechnologii
Wydział Biologii
Uniwersytet im. A. Mickiewicza w Poznaniu

Poznań, 3.08.2023

RECENZJA

pracy doktorskiej mgr Karoliny Piecyk pt.

„Mechanizmy adaptacji mitochondriów w pierwotnych fibroblastach ludzkich we wczesnych etapach starzenia; efekt daidzeiny”

Zespół prof. dr hab. Joanny Szczepanowskiej z Instytutu Biologii Doświadczalnej w Warszawie zajmuje się wyjaśnianiem podłoża molekularnego procesu starzenia a także chorób związanych z dysfunkcją mitochondriów. Z kolei, badania zespołu prof. dr hab. Pawła Kuleszy z Wydziału Chemii Uniwersytetu Warszawskiego koncentrują się na elektrochemii podstawowej i stosowanej, w szczególności na katalizie z wykorzystaniem materiałów nanostrukturalnych. Połączenie ekspertyzy obu promotorów doprowadziło do powstania pracy doktorskiej mgr Karoliny Piecyk, w której opisane zostały (i) mechanizmy adaptacji mitochondriów pierwotnych fibroblastów ludzkich we wczesnych etapach starzenia w powiązaniu z działaniem daidzeiny a także (ii) właściwości elektrochemiczne tego fitoestrogenu. W pierwotnych fibroblastach ludzkich we wczesnym okresie starzenia indukowanego przez wodoronadtlenek t-butylu (TBH) oraz replikacyjnego (pasaże p18-25) badano: (i) proliferację i intensywność podziałów komórkowych; (ii) potencjał wewnętrznej błony mitochondrialnej ($\Delta\Psi$), poziom Ca^{2+} i reaktywnych form tlenu (RFT); (iii) poziom enzymów antyoksydacyjnych oraz uszkodzeń oksydacyjnych białek; (iv) morfologię komórek i sieci mitochondrialnej oraz (v) poziom białek uczestniczących w procesach biogenezy i degradacji mitochondriów. Badanie mechanizmów adaptacji mitochondriów w pierwotnych fibroblastach ludzkich we wczesnych etapach starzenia może dostarczyć istotnych informacji na temat starzenia się organizmu ludzkiego. Badanie wpływu daidzeiny na mitochondria może pomóc w zrozumieniu, czy fitoestrogeny mają potencjał łagodzenia negatywnych skutków starzenia się komórek oraz związanych z nimi problemów zdrowotnych. Może to mieć znaczenie dla rozwoju nowych strategii terapeutycznych lub suplementacji mających na celu poprawę funkcji mitochondrialnych i opóźnienie procesów starzenia się komórek.

Formalny opis rozprawy

Praca przedstawiona do recenzji napisana jest zwięzłym i jasnym językiem. Wyróżnia ją ładna oprawa graficzna. Jednakże w pracy można znaleźć dość liczne literówki i pewne błędy stylistyczne (np. hamować/inhibować a nie „inhibitować”, hamujący/inhibujący a nie „inhibujący”). Zastrzeżenia redakcyjne dotyczą: niejednolitego zapisu pozycji literaturowych (tytułów artykułów pisanych w całości lub w przypadku tylko pierwszego słowa z dużych liter), podawania referencji bibliograficznej dopiero na koniec akapitu a nie po pierwszym zdaniu, a także brak referencji w niektórych fragmentach tekstu (np. str. 24).

Praca, licząca w sumie 149 stron, zawiera 87 rycin (wliczając fotografie i schematy) oraz 5 tabel. Układ pracy jest typowy i obejmuje: spis treści, wykaz stosowanych skrótów i oznaczeń, streszczenie w języku polskim i angielskim, wstęp, cel pracy, materiały i metody, wyniki, dyskusję, podsumowanie i wnioski, oraz liczącą 202 publikacji bibliografię, w większości złożoną z pozycji literaturowych opublikowanych w ostatnich 10 latach. Na końcu rozprawy umieszczono listę publikacji Doktorantki. Z listy tej wynika, że mgr Karolina Piecyk jest współautorką 2 publikacji powiązanych z tematem pracy doktorskiej, o łącznym

współczynnika oddziaływania $IF \sim 13$, co stanowi na tym etapie rozwoju naukowego dobry dorobek naukowy. Jestem przekonana, że wyniki badań opisane w pracy doktorskiej będą także dobrze opublikowane i wzbudzą zainteresowanie w środowisku naukowym.

Poprzedzający część doświadczalną, liczący 23 strony Wstęp stanowi jasno i zwięźle napisany przegląd aktualnego stanu wiedzy dotyczącego procesów odpowiedzialnych za dynamikę i organizację sieci mitochondrialnej. Doktorantka opisała także przyczyny i konsekwencje zaburzeń funkcjonowania mitochondriów, adaptacje mitochondriów do warunków stresowych oraz udział mitochondriów w procesie starzenia. Na końcu, znalazła się charakterystyka fitoestrogenów, w szczególności badanej w pracy daidzeiny. We Wstępie Doktorantka odnosi się do najważniejszego piśmiennictwa dotyczącego omawianych zagadnień.

Uwagi i pytania do Wstępu:

- Ryc. 6. Brakuje wytłumaczenia użytych skrótów. W niektórych przypadkach (CREB, CaMK/CaMKK, NFkB, ETC) brak tych wyjaśnień także w tekście i na liście skrótów. Nie przetłumaczono części określeń. Niepotrzebnie za oryginałem podano bardzo specyficzne czynniki modulujące np. metforminę czy ekstrakt z zielonej herbaty, do których Autorka nie odnosi się w tekście.
- Str. 18. Spolaryzowana jest wewnętrzna błona mitochondrialna a nie całe mitochondria.
- Str. 20. Proszę wytłumaczyć stwierdzenie: „Dlatego należy podkreślić, że proces mitofagii jest synergistycznie regulowany z procesem biogenezy mitochondriów, oba te procesy oddziałują na siebie.” Czy łączny efekt tych procesów jest większy niż suma efektów ich działania oddzielnie?

Rozdział Materiały i metody (21 stron) zawiera charakterystykę użytych w pracy 3 grup doświadczalnych fibroblastów, tj. komórek z hodowli pomiędzy 5 a 10 pasażem – kontrolnych i poddanych działaniu TBH (model starzenia indukowanego) oraz komórek pomiędzy 18 i 25 pasażem (model starzenia replikacyjnego). Znajdują się tu także staranne opisy stosowanych metod badawczych. Uwagę zwraca duża różnorodność stosowanych technik, świadcząca o dużej kompetencji Doktorantki w pracy doświadczalnej. Podczas badań prowadzono: hodowlę linii komórkowych, pomiar tempa proliferacji komórek, immunologiczną detekcję białek, wizualizację sieci mitochondrialnej przy użyciu mikroskopii konfokalnej, pomiar potencjału błonowego mitochondriów, masy mitochondriów, cytozolowego stężenia jonów wapnia i poziomu RFT przy użyciu laserowego cytometru skaningowego. Do fluoroscencyjnej wizualizacji mitochondriów stosowano różne sondy fluorescencyjne np. MitoTraker (oznaczanie masy mitochondriów), MitoTimer (badanie wieku mitochondriów) oraz barwienie immunofluorescencyjne (badanie morfologii sieci mitochondrialnej). W pracy przeprowadzono także immunodetekcję szeregu białek. Do charakterystyki elektrochemicznej daidzeiny wykorzystano technikę woltamperometrii cyklicznej

Uwagi i pytania do rozdziału Materiały i metody:

- Czy użycie w niektórych badaniach innej linii fibroblastów (wyprowadzonych od innego dawcy) z pasaży 52-53 jest uzasadnione? Czy próbowano wydłużyć linię podstawową (PCS-201-012) do ~50 pasaży?
- Czy potwierdzono skrócenie telomerów w fibroblastach z pasaży 18-25?
- Czy mała liczba większości doświadczeń ($n = 3$) nie utrudnia analizy ilościowej i interpretacji otrzymanych wyników?

Głównym celem badań opisanych w ocenianej pracy była analiza adaptacji mitochondriów na drodze wstecznej kaskady sygnałowej we wczesnym okresie starzenia

indukowanego i replikacyjnego pierwotnych fibroblastów oraz wpływu fitoestrogenu - daidzeiny - na te procesy.

W rozdziale Wyniki, który obejmuje 63 strony, Autorka zwięźle przedstawia wyniki kolejno realizowanych zadań badawczych. Na podkreślenie zasługuje sposób prowadzenia czytelnika przez poszczególne etapy pracy eksperymentalnej i wyjaśnianie poszczególnych kroków. Wyniki prezentowane są w logicznej kolejności i tworzą spójną całość. Każdy punkt otwiera krótkie wprowadzenie i kończy krótkie podsumowanie, porządkujące kolejne etapy badawcze. Ze względu na różne zmiany obserwowane dla licznych badanych parametrów, analiza otrzymanych wyników była czasami trudna, nie zawsze prowadząc do jednoznacznej interpretacji. Trzeba podkreślić, że Doktorantka, zachowując krytycyzm, umiejętnie analizowała otrzymane wyniki. Przedstawione wyniki przeprowadzonych doświadczeń wskazują na podniesiony poziom RFT, wzrost uszkodzeń oksydacyjnych białek oraz aktywację procesu autofagii/mitofagii zarówno w modelu starzenia indukowanego jak i replikacyjnego, choć adaptacja mitochondriów wydaje się odmienna. W przypadku silnego, choć krótkotrwałego stresu oksydacyjnego (starzenie indukowane) nie obserwowano wyraźnych zmian odpowiedzi związanej z adaptacją mitochondriów do stresu. W łagodnym lecz długotrwałym stresie (starzenie replikacyjne) obserwowano adaptację mitochondriów poprzez rearanżację sieci mitochondrialnej a także poprzez brak zmian w równowadze pomiędzy procesami biogenezy i degradacji mitochondriów. Podniesione poziomy RFT i Ca^{2+} wskazują na możliwą indukcję wstecznej kaskady sygnałowej w obu modelach wczesnych etapów starzenia fibroblastów. Jedynie w przypadku komórek z indukowanym i replikacyjnym starzeniem, daidzeina wykazała działanie antyoksydacyjne (obserwowane poprzez zmniejszony poziom RFT i zmniejszony poziom uszkodzeń oksydacyjnych białek) o potencjalnie pozytywnym wpływie na funkcjonowanie mitochondriów. Co zaskakujące, daidzeina wykazywała działanie prooksydacyjne w młodych fibroblastach, co kłóci się z wykorzystaniem tego fitoestrogenu jako uniwersalnego związku antyoksydacyjnego.

Oto kilka uwag i spostrzeżeń do przedyskutowania:

- Fot. 4.1. Przedstawione wyniki doboru stężenia i czasu inkubacji z TBH nie są przekonujące. Dlaczego nie użyto metody ilościowej? Ponadto, czy rzeczywiście jak pisze Autorka: „W przypadku użycia 50 μM stężenia TBH efekt ten był obserwowany po 2 godzinach, a dla stężenia 100 μM TBH po 3 godzinach.”?
- W legendach rycin, w których wyniki nie wykazywały istotności statystycznej umieszczono niepotrzebną informację: „Istotność statystyczną zbadano testem t-Studenta oraz oznaczono symbolami: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.”
- Str. 88. O jakim fizjologicznym stężeniu daidzeiny mowa? Czy o stężeniu tego fitoestrogenu oznaczanym u ludzi (kobiet) po suplementacji? Ponadto Autorka pisze: „Do dalszej części badań zdecydowano się na stężenia 0,1 i 0,5 nM, gdyż po ich zastosowaniu zaobserwowano zmiany w badanych liniach.” A przecież widoczna jest tylko jedna istotna statystycznie zmiana przy stężeniu 0,5 nM dla linii TBH?
- W większości pokazanych wyników immunodetekcji, bloty są bardzo przycięte i trudno ocenić specyficzność zastosowanych przeciwciał.
- Czy dla oceny ilości mitochondriów w poszczególnych grupach fibroblastów nie należałoby zbadać poziomu markerów mitochondrialnych, tj., oksydazy cytochromu c (COX) czy syntazy cytrynianowej (CS)?

Liczący 14 stron i podzielony na 3 punkty rozdział Dyskusja w zasadzie wyczerpuje aspekty wynikające z wyników własnych na tle w pełni wykorzystanych wyników innych badaczy. W rozdziale tym przedyskutowano dobór i charakterystykę modelu badawczego

oraz właściwości mitochondriów we wczesnym okresie starzenia. Przedyskutowano i porównano także wpływ daidzeiny na badane funkcjonalne i morfologiczne parametry mitochondriów fibroblastów. Doktorantka solidnie i krytycznie przedyskutowała otrzymane wyniki, choć ich interpretacja nie zawsze była jednoznaczna.

W czasie lektury tej części pracy nasunęły mi się uwagi:

- We Wstępie omówiono dobroczynne działanie daidzeiny i innych fitoestrogenów stosowanych doustnie. Biorąc pod uwagę badania na fibroblastach nasuwa się pytanie, czy daidzeina jest składnikiem preparatów stosowanych na skórę?
- Czy coś wiadomo na temat aktywacji apoptozy czy poziomu białek zaangażowanych w ruch mitochondriów w badanych modelach badawczych wczesnych etapów starzenia fibroblastów?

Podsumowanie

Wspomniane wcześniej uwagi oraz błędy językowo-redakcyjne nie mają wpływu na moją pozytywną ocenę przedstawionej pracy, jej wartości merytorycznej oraz znaczenia przeprowadzonych badań. Wyniki eksperymentów przedstawione w rozprawie są istotne dla zrozumienia molekularnego podłoża procesu starzenia komórek, a także dobroczynnego działania daidzeiny i - w dalszej perspektywie - mogą prowadzić do potencjalnych terapeutycznych rozwiązań. Badania opisane w ocenianej pracy doktorskiej są także ważne dla zrozumienia znaczenia mitochondriów w funkcjonowaniu i starzeniu komórek. Biorąc pod uwagę merytoryczną i innowacyjną wartość pracy, znaczenie przeprowadzonych badań, dużą pracowitość i różnorodność doświadczeń i analiz, a także umiejętność prezentowania i dyskusowania wyników, uważam że przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478, 619, 1630). Wnioskuje zatem o dopuszczenie mgr Karoliny Piecyk do dalszych etapów przewodu doktorskiego oraz o wyróżnienie pracy doktorskiej stosowną nagrodą.



Prof. dr hab. Wiesława Jarmuszkiewicz



Warszawa, 01-08-2023

Dr hab. Róża Kucharczyk

Pracownia Bioenergetyki i Mechanizmów Chorób Mitochondrialnych

Instytut Biochemii i Biofizyki PAN

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Karoliny Piecyk "Mechanizmy adaptacji mitochondriów w pierwotnych fibroblastach ludzkich we wczesnych etapach starzenia; efekt daidzeiny".

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska mgr Karoliny Piecyk została wykonana w Pracowni Metabolizmu Komórki Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN oraz w Pracowni Elektroanalizy i Elektrokatalizy Chemicznej Wydziału Chemii Uniwersytetu Warszawskiego. Prace badawcze zostały przeprowadzone pod kierunkiem prof. dr hab. Joanny Szczepanowskiej oraz prof. dr hab. Pawła Kuleszy.

Mitochondria są półautonomicznymi organellami posiadającymi własny genom kodujący 13 białek systemu fosforylacji oksydacyjnej i stanowiących jedynie promil mitochondrialnego proteomu. Zatem funkcje mitochondriów są zależne od ekspresji genów jądrowych. Ta z kolei jest regulowana zapotrzebowaniem mitochondriów, m.in. na drodze sygnalizacji mitochondria - jądro. Mitochondria, a raczej sieć mitochondrialna jest bardzo dynamiczna i zmieniają się zależnie od zapotrzebowania komórki na ATP, ale też w funkcji różnych stresów jakie na nią działają - procesów chorobowych i starzenia. Ich rola w odpowiedzi komórki na stres jest dobrze udokumentowana w literaturze a mitochondria jako cel terapeutyczny w wielu dysfunkcjach są przedmiotem badań przez wiele zespołów na świecie, nie tylko w zakresie poszukiwania aktywnych leków ale przede wszystkim zrozumienia jak one modulują metabolizm mitochondrialny. Współczesna medycyna coraz częściej zagląda do medycyny tradycyjnej, z tą jednak różnicą, mając współczesne narzędzia, że szukamy zrozumieć i poznać jakie związki aktywne występują w naturze i jaki jest ich mechanizm działania na fizjologię komórki. W ten trend badawczy wpisuje się przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska pani mgr Karoliny Piecyk.

Autorka rozprawy jako temat badań przyjęła charakterystykę zmian biogenezy i fizjologii mitochondriów w trakcie starzenia komórki oraz zbadanie czy i w jaki sposób na te zmiany wpływa daidzeina - naturalnie występujący m.in. w nasionach soi, fitoestrogen. Aby osiągnąć ten cel Autorka wykorzystała komórki pierwotnych fibroblastów w fazie hodowli późnej (na późnych pasażach) lub eksponowanych na wodoronadtlenek tert-butyli (TBH), co również indukowało starzenie komórek. Następnie scharakteryzowała fizjologię mitochondriów (poprzez pomiary zmian w potencjale wewnętrznej błony mitochondrialnej, poziomu jonów Ca^{2+} i reaktywnych form tlenu w komórce), procesów, które prowadzą do adaptacji mitochondriów na drodze wstecznej kaskady sygnałowej (biogenezy, morfologii sieci mitochondrialnej oraz indukcji auto- i mitofagii), a następnie wpływu daidzeiny na te zmiany.

Wykorzystując szereg metod biologii komórki i biologii molekularnej oraz mikroskopię konfokalną i cytometrię przepływową pani Piecyk zrealizowała zaplanowane badania. W pierwszej części rozprawy Autorka scharakteryzowała badaną linię komórkową po ekspozycji na TBH oraz w fazie późnej podziałów pod względem czasu generacji, intensywności podziałów komórkowych i ilości komórek starzejących się, zmian w potencjale wewnętrznej błony mitochondrialnej, poziomu jonów Ca^{2+} i reaktywnych form tlenu w komórce, zmian w poziomie wybranych enzymów antyoksydacyjnych, karbonylacji białek komórkowych, morfologii i architektury sieci mitochondrialnej, masy mitochondriów i poziomu białek zaangażowanych w biogenezę mitochondriów, jako markerów zaburzeń w biogenezie mitochondriów. W drugiej części rozprawy Autorka zbadała wpływ daidzeiny na proliferację komórek i ilość komórek starzejących się w obu badanych warunkach, zmiany w potencjale wewnętrznej błony mitochondrialnej, poziomie Ca^{2+} i reaktywnych form tlenu w komórce oraz w mitochondriach, wpływ na biogenezę, masę mitochondriów i morfologię sieci mitochondrialnej, poziom enzymów antyoksydacyjnych i

karbonylacji białek oraz poziom auto- i mitofagii. Dodatkowo zbadany został poziom receptora estrogenowego α (ER α) w komórkach traktowanych daidzeiną.

Autorka zaobserwowała, szczególnie w komórkach w późnej fazie podziałów, wyraźnie więcej komórek starzejących się, wyznaczonych miarą aktywności SA- β -galaktozydazy, oraz zmiany w morfologii sieci mitochondrialnej, wzrost w poziomie H₂O₂ (w obu badanych warunkach), obniżenie poziomu MnSOD (w starszej hodowli), katalazy (w obu badanych warunkach), oraz podwyższenie poziomu GPx (w starszej hodowli), zmiany w poziomie karbonylacji białek (w obu badanych warunkach) oraz indukcję autofagii (w obu badanych warunkach). W eksperymentach Autorki wpływ daidzeiny spowodował: wzrost potencjału wewnętrznej błony mitochondrialnej w komórkach traktowanych TBH, wzrost jonów Ca²⁺ w komórkach w późnej fazie hodowli, wzrost H₂O₂ w komórkach kontrolnych, ale spadek w komórkach starzejących się (w obu typach hodowli), wyraźny wzrost poziomu jonów Ca²⁺ w cytoplazmie, obniżenie poziomu białka SOD1 w komórkach obu typów hodowli, obniżenie poziomu katalazy oraz reduktazy glutationowej w komórkach traktowanych TBH z jednoczesnym wzrostem akumulacji białka GPx. Istotnym wynikiem jest wpływ daidzeiny, w sposób zależny od stężenia, na obniżenie poziomu karbonylacji białek w obu typach hodowli, oraz na indukcję autofagii w komórkach traktowanych TBH i brak istotnego wpływu na sieć mitochondrialną. Ciekawym wynikiem jest wpływ daidzeiny na obniżenie / spowolnienie procesu odnowy mitochondriów w obu typach hodowli - innymi słowy pula mitochondriów „starszych” w komórce była większa.

Wykonane eksperymenty pozwoliły zaobserwować różnice w odpowiedzi związanej z adaptacją mitochondriów pomiędzy warunkami stresu krótkotrwałego lecz silnego a warunkami stresu łagodnego a długotrwałego. Uzyskane wyniki pozwoliły na konkluzję, że daidzeina ma pozytywne, głównie antyoksydacyjne działanie w komórkach podanych stresowi, jednak ma ona pro-oksydacyjne działanie w komórkach młodych, nie poddanych stresowi. Jest to obserwacja warta dalszych badań, by zrozumieć jakie mechanizmy leżą u podstaw tych dwóch sprzecznych reakcji w komórkach na ten sam związek.

Rozprawa doktorska została przygotowana w języku polskim, z zastosowaniem klasycznego układu podziału tekstu na: Wstęp, Materiały i metody, Wyniki, Dyskusję, Spis literatury oraz Listę publikacji, łącznie 149 stron tekstu. „Wstęp” został poprzedzony streszczeniem napisanym w języku polskim oraz angielskim. Dobrze zaplanowane rysunki dopełniają tekst, niemniej, jedynie Rycina 6 jest cytowana w tekście „Wstępu”, pozostałe Ryciny tego rozdziału nie są zacytowane w tekście. Rozdział „Wstęp”, obejmujący 21 stron, stanowi bardzo dobre, jednakże dość ogólnie ujęte, wprowadzenie do tematyki badań. Autorka wspomina o wstecznej kaskadzie sygnałowej na linii mitochondria-jądro, jednak brak bardziej szczegółowych informacji o jej efektorach, białkach w nią zaangażowanych (zresztą wykorzystanych w badaniach Autorki), informacji o mechanizmach tej ścieżki sygnałowej, o uzupełnienie których prosiłabym w trakcie publicznej obrony.

W 21 stronicowym rozdziale „Materiały i metody” w poprawny i szczegółowy sposób opisane zostały stosowane metody badawcze, typowe w pracy na modelach komórkowych. Informacje zawarte w tym rozdziale umożliwiają analizę przeprowadzonych eksperymentów, a w przyszłości ich powtórzenie przez niezależnych badaczy. Zastosowana metodyka badań jest odpowiednio dobrana do stawianych celów badawczych. Cenny jest Schemat 1 tego rozdziału, gdyż wraca się do niego często w trakcie lektury rozdziału „Wyniki”.

W rozdziale „Wyniki” (63 strony) Autorka przedstawiła wyniki przeprowadzonych eksperymentów. Eksperymenty zostały wykonane z należytą starannością, stanowią logiczny ciąg od ustalenia warunków pracy, np. stresu, wieku hodowli, czy stężenia daidzeiny po właściwe eksperymenty i wnioski z nich wynikające. Forma opisu wyników jest niezwykle zwięzła, ogranicza się właściwie do opisu ryciny, co powodowało niejednokrotnie konieczność powrotu do rozdziału „Materiały i metody”, aby zrozumieć w jaki sposób eksperyment został przeprowadzony. W niektórych przypadkach zdanie opisu jak eksperyment został przeprowadzony ułatwiłoby śledzenie tego rozdziału. Bardzo pomocne są dwie zbiorcze tabele sumujące uzyskane obserwacje w tej części rozprawy: jedna po opisie pierwszej części wyników, podsumowująca jakie zmiany w badanych parametrach zachodzą w komórkach traktowanych TBH i tych z późniejszej fazy hodowli, oraz druga po opisie wyników drugiej części - efektu daidzeiny na badane aspekty fizjologii komórki w tych dwóch modelach. Główne wyniki uzyskane przez Autorkę zostały opisane powyżej. W tym

miejsu chciałabym poprosić jedynie Autorkę o uzupełnienie / komentarz do następujących zagadnień:

- Rycina 4.1, pierwsza, gdyż są w pracy dwie ryciny oznaczone tym numerem, Autorka pisze o wzroście śmiertelności pokazując zdjęcia komórek. Proszę podać w jaki sposób rozróżniono komórki umarłe i ile wzrost ten wynosił, czy był wyrażony w %-ach? Nie ma tych informacji w tekście.

- Legenda do Ryciny 4.15 podaje „łącznie co najmniej 60 mitochondriów”. W jaki sposób wyodrębniono jedno mitochondrium?

Autorka wyniki swoich badań odnosi do wyników innych badaczy w rozdziale „Dyskusja”, omawiając je i analizując na tle danych literaturowych. Ten rozdział rozprawy potwierdza umiejętność samodzielnej krytycznej analizy swoich danych oraz ogólną wiedzę teoretyczną Kandydatki w dyscyplinie. Autorka potrafi stawiać hipotezy w jaki sposób wyjaśnić swoje, niejednokrotnie sprzeczne wyniki. Np. na stronie 132 Autorka zaproponowała mechanizm teoretyczny wyjaśniający zmiany w poziomie różnych RFT w cytoplazmie i mitochondriach pod wpływem daidzeiny skoniugowanej z TPP⁺. Warto byłoby ten, spekulacyjny co prawda, jak sama Autorka napisała, model przedstawić schematycznie. Rozdział „Dyskusji” opatrzone jest podsumowaniem wniosków z rozprawy, w sposób szczegółowy i ogólny. Takie podsumowanie jest konieczne przy tego typu badaniach. Czuję nadal jednak niedosyt, czy badania jakie przeprowadziła Autorka pozwalają na wniosek, że tu zacytuję „We wczesnych etapach starzenia, zarówno indukowanego jak i replikacyjnego, może następować indukcja wstecznej kaskady sygnałowej poprzez podniesiony poziom RFT i Ca²⁺ w komórce.” Może to wynikać z brakujących informacji na temat mechanizmu tej ścieżki sygnałowej - o ile jest znany. Poproszę o odniesienie się do tej kwestii w trakcie obrony.

Bibliografia zawiera 202 pozycje wskazujące, że Autorka wykazała się znajomością literatury dotyczącej przedmiotu badań, niemniej trzy świeże prace z obszaru badań zostały pominięte i nie wykorzystane we „Wstępie” czy „Dyskusji” (PMID 34673406, 29436666, 28400805).

Po lekturze rozprawy, stwierdzam, że Autorka opanowała umiejętność przygotowywania tekstów naukowych. Autorka nie ustrzegła się zapożyczenia słownictwa z języka angielskiego, np. „inhibicja” zamiast „hamowanie”, i nielicznych literówek, co oczywiście nie umniejsza mojego powyższego wniosku.

Podsumowanie

Wyniki prac badawczych zaprezentowanych w rozprawie nie zostały opublikowane. Mgr Karolina Piecyk jest jednakże współautorką dwóch innych artykułów. Można spodziewać się, że dorobek mgr Karoliny Piecyk poszerzy się o kolejną publikację opisującą wyniki rozprawy. Podsumowując, w mojej opinii praca doktorska przedstawiona przez mgr Karolinę Piecyk spełnia wszystkie wymagania potrzebne do uzyskania stopnia doktora nauk biologicznych, określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2021 r. poz. 478, 619, 1630). W związku z tym rekomenduję Radzie Naukowej Instytutu Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego PAN o przyjęcie mgr Karolinę Piecyk do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

