

Zakład Biologii Medycznej
Instytut Biologii
Uniwersytet Jana Kochanowskiego w Kielcach
ul. Świętokrzyska 15
25-406 Kielce
tel. 41 349 63 31
email: arabski@ujk.edu.pl

Kielce, 21.08.2023

Dr hab. Michał Arabski
Zakład Biologii Medycznej
Wydział Nauk Ścisłych i Przyrodniczych
Uniwersytet Jan Kochanowskiego w Kielcach

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

mgr Dawida Stulczewskiego

*Działanie kwasu dokozaheksaenowego i eikozapentaenowego na czynność mitochondriów
i przeżywalność astrocytów*

Prawidłowe funkcjonowanie ośrodkowego układu nerwowego warunkuje wysoka podaż energii, która jest wymagana do przeżycia i prawidłowej pobudliwości neuronów. Ten stan homeostazy jest zależny od mitochondriów, a ich dysfunkcja leży u podstaw chorób o podłożu neurodegeneracyjnym. Zaburzenie funkcjonowania mitochondriów prowadzi nie tylko do obniżonej produkcji ATP, lecz również zaburzeń wewnątrzkomórkowej regulację jonów wapnia, uwalniania protez czy potencjału redoks. Wyniki badań molekularnych wskazują również na udział zmutowanych białek mitochondrialnych w patomechanizmie chorób neurodegeneracyjnych, jak amyloidu beta w chorobie Alzheimera, SOD1 w stwardnieniu zanikowym bocznym czy α -synukleiny w chorobie Parkinsona, co prowadzi do zwiększonej produkcji wolnych rodników, niskiej produkcji komórkowego ATP, a ostatecznie do śmierci komórki. Poszukiwanie strategii mającej na celu poprawę funkcji mitochondriów stanowi obecnie istotne wyzwanie o charakterze klinicznym w kontekście schorzeń stanowiących problem o zasięgu światowym. Przedstawiona mi do recenzji praca doktorska Pana mgr Dawida Stulczewskiego pt. *Działanie kwasu dokozaheksaenowego i eikozapentaenowego na czynność mitochondriów i przeżywalność astrocytów* wpisuje się w powyższą tematykę badań związaną z efektem dwóch pochodnych długołańcuchowych wielonasyconych kwasów tłuszczowych tj. DHA oraz EPA na biochemię i strukturę mitochondriów m in. w kontekście klinicznym. Praca doktorska Pana mgr Dawida Stulczewskiego stanowiąca podstawę do nadania stopnia doktora została wykonana w

Zakładzie Interakcji Międzykomórkowych Katedry Fizjologii Doświadczalnej i Klinicznej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi pod kierunkiem dr hab. n med. Anny Walczewskiej (promotor) oraz dr n med. Emilii Zgórzyńskiej pełniącej funkcję promotora pomocniczego.

W dalszej części recenzji odniosę się do poszczególnych jej części. Rozprawa o strukturze typowej dla prac doświadczalnych to starannie przygotowane opracowanie naukowe świadczące o wiedzy teoretycznej z zakresu poruszanej tematyki i umiejętnościach pracy laboratoryjnej i wnioskowania Doktoranta.

WSTĘP rozprawy to pełne, usystematyzowane wprowadzenie do części doświadczalnej rozprawy. Zagadnienia związane z tematyką rozprawy omówione są na poziomie komórkowym, biochemii mitochondrium, a następnie molekularnym tj. składu lipidów błon mitochondrialnych w odniesieniu do badanych w pracy DHA oraz EPA. W pierwszej części Doktorant omówił rolę astrocytów w OUN, w tym w tworzeniu bariery krew-mózg, ich udział w homeostazie jonowo-metabolicznej w mózgu oraz zagadnienia związane z bioenergetyką astrocytów. Część druga odnosi się bezpośrednio do biochemii mitochondriów w astrocytach i dotyczy ona nie tylko mechanizmów wykorzystywanych przez mitochondria do sprzęgania utleniania metabolitów z syntezą ATP, lecz również ich udziału w procesie apoptozy oraz gospodarce jonów wapnia. Na podkreślenie zasługuje wysoki poziom szczegółowości związany z prezentacją danych literaturowych odnoszących się do znaczenia DHA oraz EPA dla czynności układu nerwowego. Doktorant odnosi się prawidłowo do najnowszych publikacji związanych z tematyką pracy. Do tej części rozprawy mam pytanie związane z efektem DHA i EPA na metabolizm kwasu arachidonowego jako prekursora prostaglandyn, leukotrienów i tromboksanów w przebiegu procesu zapalnego. Czy znane są Doktorantowi prace związane z hamującym efektem obu badanych w rozprawie pochodnych długołańcuchowych wielonasyconych kwasów tłuszczowych na przewlekły charakter procesu zapalnego, który pośrednio może być źródłem wolnych rodników indukujących uszkodzenia mitochondrialnego DNA?

Kolejny rozdział pracy to opis jej CELU. Jest on przedstawiony w sposób klarowny i dotyczy oceny niezależnego działania DHA i EPA na przeżywalność astrocytów oraz wybrane aktywności biochemiczne i czynnościowe mitochondriów. Na cel główny składają się zadania szczegółowe związane z oznaczeniem potencjału błony mitochondrialnej z wizualizacją sieci, ocena właściwości proapoptotycznych oraz produkcji reaktywnych form tlenu i azotu. Cel pracy został osiągnięty, co stanowi nowo wiedzę w zakresie poruszanej tematyki.

Rozdział MATERIAŁY i METODYKA zawiera szczegółowy opis wykonanych oznaczeń. Opis poszczególnych metod zaopatrzone jest w opis zasady i celowości oznaczeń. Tutaj mam pytanie dotyczące warunków inkubacji komórek w trakcie ich hodowli i traktowania badanymi związkami, tzn. prowadzono ją w cieplarni czy inkubatorze CO₂.

W opisie w ramach rozdziału WYNIKI wykazano spadek żywotności astrocytów w obecności DHA w przeciwieństwie do EPA w badanym zakresie stężeń zmierzony testem MTT. Podobną różnicę na żywotność astrocytów obu badanych związków wykazano w funkcji czasu inkubacji. Zarówno DHA jak i EPA zaburzyły pod kątem ilościowym skład kwasów tłuszczowych błony mitochondrialnej. Tutaj mam prośbę o szerszą interpretację powyższych wyników. Oba badane kwasy tłuszczowe charakteryzował podobny efekt na przeżywalność astrocytów wobec CCCP i nadtlenu wodoru, obniżały produkcję reaktywnych form tlenu i azotu, nie zaobserwowano zmian struktury i rozmieszczenia sieci mitochondrialnej oraz spadek współczynnika Bax/Bcl2 jako markera apoptozy. Różnice w aktywności biologicznej DHA i EPA dotyczyły wartości potencjału błony mitochondrialnej w podłożu z glukozą i galaktozą w astrocytach spoczynkowych i po rozprężaniu ETC w obecności glukozy (wyższy dla EPA). Efekt ten nie był związany z poziomem komórkowym ATP w obecności EPA. Ponadto EPA wpłynął na zwiększenie zawartości kardiolipiny w błonach mitochondriów. Do tej części rozprawy mam pytanie dotyczące kardiolipiny która odgrywa kluczową rolę w procesach związanych z funkcją i dynamiką mitochondriów, prawidłowej morfologii, stabilności i dynamice błony mitochondrialnej, w biogenezie mitochondriów i imporcie białek, w mitofagii oraz przebiegu apoptozy. Jednym z czynników przyczyniającym się do patogenezy choroby Parkinsona jest agregacja białka α -synukleiny oraz zdolnością do interakcji z błonami biologicznymi. Jako rolę w tych oddziaływaniach może pełnić kardiolipina oraz EPA? Ponadto w pracy wykazano efekt hamujący EPA na procent komórek apoptotycznych w stosunku do kontroli z wykorzystaniem barwienia jodek propidyny/Aneksyna 5 i techniki cytometrii przepływowej. Biorąc pod uwagę bardzo niewielkie różnice pomiędzy próbami, mam pytanie czy efekt ten obserwowano w niezależnych powtórzeniach.

Rozdział PODSUMOWANIE WYNIKÓW I DYSKUSJA zawiera dojrzałą naukowo interpretację wyników badań własnych w odniesieniu do najnowszych danych literaturowych. Doktorant podkreśla potencjalny charakter aplikacyjny badań i krytycznie odnosi się do uzyskanych wniosków wskazując na potrzebę poszerzenia badań w kontekście efektów DHA i EPA na proces glikoliz i fosforylacji oksydacyjnej w astrocytach.

Podsumowując stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska Pana mgr Dawida Stulczewskiego pt. *Działanie kwasu dokozaheksaenowego i eikozapentaenowego na czynność mitochondriów i przeżywalność astrocytów* stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego i 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. nr 65, poz. 595 z późn.zm). Biorąc pod uwagę udokumentowaną umiejętność prowadzenia badań naukowych oraz wiedzę teoretyczną wnoszę do Rady Nauk Medycznych Uniwersytetu Medycznego w Łodzi o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie Pana mgr Dawida Stulczewskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Michał Awboły