

Białystok, 25.09.2023

Dr hab. n med. Piotr Zabielski  
Zakład Biologii Medycznej  
Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku

**Ocena rozprawy doktorskiej mgr Dawida Stulczewskiego**  
**pt. „Działanie kwasu dokozaheksaenowego i eikozapentaenowego na czynność**  
**mitochondriów i przeżywalność astrocytów”**  
**przygotowanej pod kierunkiem**  
**dr hab. n med. Anny Walczewskiej**  
**(promotor pomocniczy dr n med. Emilia Zgórzyńska)**

**UWAGI WSTĘPNE**

Rozprawa doktorska pt. **„Działanie kwasu dokozaheksaenowego i eikozapentaenowego na czynność mitochondriów i przeżywalność astrocytów”**, została przygotowana przez mgr Dawida Stulczewskiego pod opieką naukową dr hab. n. med. Anny Walczewskiej (prof. Uczelni), kierownika Zakładu Interakcji Międzykomórkowych Uniwersytetu Medycznego w Łodzi. Rozprawa doktorska została przygotowana w formie monografii. Część wyników uzyskanych w trakcie realizacji badań zawartych w Rozprawie została opublikowana w anglojęzycznym czasopiśmie *Experimental Cell Research* w roku 2023 (Stulczewski, Dawid et al. “EPA stronger than DHA increases the mitochondrial membrane potential and cardiolipin levels but does not change the ATP level in astrocytes.” *Experimental Cell Research* vol. 424,1 (2023): 113491; IF=3,7, MNISW=100). Badania sfinansowano w ramach grantu zewnętrznego Narodowego Centrum Nauki i Rozwoju (DKO/PL-TW1/4/2013) oraz grantu Uniwersytetu Medycznego w Łodzi (503/0-079-04/503-01-001).

*Zeli* 1

Łączny dorobek doktoranta zawarty składa się z 4 prac oryginalnych w języku angielskim i 1 pracy przeglądowej w języku polskim, o całkowitym wskaźniku IF=11,5 oraz punktacji MNISW=330 punktów.

## PODJĘTY TEMAT BADAWCZY

Tematem rozprawy doktorskiej jest wpływ kwasu dokozaheksaenowego (DHA) oraz eikozapentaenowego (EPA) na wybrane parametry metabolizmu mitochondrialnego astrocytów izolowanych z kory mózgowej szczurów. Procedury pozyskania materiału do badań zostały zaakceptowane przez lokalną komisję etyczną do spraw doświadczeń na zwierzętach (uchwała nr 59 LB680/2013).

Za podjęciem przez Doktoranta powyższej tematyki badań przemawia znaczący ogólnoświatowy wzrost zapadalności na choroby neurodegeneracyjne, w tym chorobę Alzheimera, chorobę Parkinsona i stwardnienie zanikowe boczne (ALS). Związane jest to z wzrastającym odsetkiem osób w wieku powyżej 60 roku życia. Prognozy wskazują, iż w Europie i Stanach Zjednoczonych Ameryki Północnej w 2030 roku około 25% populacji stanowić będą osoby 60+, a ogólnoświatowe, roczne wydatki związane z terapią oraz opieką nad osobami cierpiącymi na choroby neurodegeneracyjne przekroczy 2 biliony dolarów. W związku z powyższym, badania związane z diagnostyką chorób neurodegeneracyjnych, leczeniem farmakologicznym oraz zmniejszaniem zapadalności wydają się kluczowe w osłabieniu tego ogólnoświatowego trendu. Głównym czynnikiem stymulującym rozwój chorób neurodegeneracyjnych, oprócz obciążenia genetycznego, jest akumulacja uszkodzeń oksydacyjnych w obrębie ośrodkowego układu nerwowego (OUN). Uszkodzenia oksydacyjne związane są z zaburzeniami szeregu aspektów metabolizmu mitochondrialnego. Należą do nich procesy takie jak podział i fuzja sieci mitochondrialnej, kontrola mitofagii czy też zaburzenia w funkcjonowaniu mitochondrialnego łańcucha oddechowego. Każdy z powyższych procesów jest składową zjawiska dysfunkcji mitochondriów prowadzącej do obniżenia tempa produkcji ATP i zwiększenia emisji reaktywnych form tlenu i azotu, wywołujących uszkodzenia oksydacyjne białek, lipidów oraz materiału genetycznego zarówno w obrębie samych mitochondriów jak i ich komórek macierzystych.

Kluczową rolę w zapewnieniu odpowiedniego środowiska funkcjonowania neuronów pełnią astrocyty. Stanowią one najliczniejszą populację komórek OUN. Biorą udział w procesach takich jak formowanie i zanikanie synaps, dostarczanie substratów energetycznych okolicznym komórkom nerwowym, metabolizm neurotransmiterów, a także ochronie antyoksydacyjnej w obrębie OUN. Zważywszy na istotną rolę prawidłowej funkcji mitochondriów w zachowaniu niskiego poziomu uszkodzeń oksydacyjnych w OUN, niezbędnym jawi się poszukiwanie czynników zdolnych do powstrzymania postępującej dysfunkcji mitochondriów komórek mózgowych. Szereg badań klinicznych wskazuje na ochronne działanie suplementacji długłańcuchowymi kwasami n-3 (LC-PUFA n-3, kwas eikozapentaenowy EPA i dokozaheksaenowy DHA) w początkowych stadiach choroby Alzheimera i

demencji związanej z wiekiem. Oprócz istotnego udziału w wyłapywaniu wolnych rodników, zapewniają one prawidłową płynność błon biologicznych. Dlatego też celem recenzowanej pracy doktorskiej było zbadanie wpływu kwasu EPA i DHA na przeżywalność oraz wybrane aspekty czynności mitochondriów astrocytów izolowanych z kory mózgu szczura. W związku z powyższym, tematyka podjęta przez Doktoranta jawi się jako bardzo aktualna, wychodząca naprzeciw spodziewanym problemom które dotyczyć będą przyszłe społeczeństwa, wpisująca się w ogólną tendencję stosowania niefarmakologicznych terapii chorób cywilizacyjnych.

## **ANALIZA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ**

Rozprawa zawarta jest na 124 stronach, zawierających obszerny wykaz stosowanych skrótów, spis treści, wstęp, cel badań, opis użytych materiałów, metodykę pozyskania materiału oraz oznaczeń biochemicznych, wyniki, podsumowanie wyników i dyskusję, streszczenie w języku polskim i angielskim, spis rycin i tabel oraz bibliografię liczącą aż 347 pozycji. Stanowczo większość pozycji zawartych w bibliografii została opublikowana po roku 2015. Praca posiada typową strukturę monografii. Została przygotowana w sposób staranny i opatrzona rycinami o wysokiej jakości.

We wstępie rozprawy Doktorant w syntetyczny sposób przedstawił rolę astrocytów w prawidłowym funkcjonowaniu OUN. W szczególności skupił się na udziale astrocytów w tworzeniu bariery krew-mózg, utrzymaniu homeostazy jonowo-metabolicznej, istotnej funkcji w ochronie przed nadmierną akumulacją glutaminianu i metabolizmie kwasu  $\gamma$ -aminomasłowego (GABA). W kolejnych podrozdziałach Autor w szczegółowy sposób omawia funkcję antyoksydacyjną astrocytów, w tym znaczenie czynnika Nrf2 w regulacji odpowiedzi antyoksydacyjnej, astrocytarnego metabolizmu glutationu (GSH) i związanych z nim enzymów oraz roli udziału oksydaz NADPH i mitochondriów w emisji wolnych rodników. Autor płynnie przechodzi do omówienia bioenergetyki astrocytów, skupiając się na szczególnych aspektach metabolizmu tej grupy komórek OUN, jakim jest przewaga procesu glikolizy and fosforylacją oksydacyjną, zapewniającą większą odporność na niedotlenienie tkankowe oraz udział astrocytów w metabolizmie glikogenu i kwasu mlekowego. W dalszych częściach wstępu, Autor skupia się na aspektach metabolizmu astrocytów bezpośrednio związanych z tematem pracy, czyli czynnością mitochondriów ze szczególnym naciskiem na dynamikę tworzenia i rozpadu sieci mitochondrialnej (fission/fussion),  $\beta$ -oksydacji kwasów tłuszczowych, mitochondrialnych źródłach wolnych rodników i udziału w tym procesie łańcucha transportu elektronów (ETC). Jednym z ciekawszych - zdaniem recenzenta - tematów opisanych w tej części rozprawy jest charakterystyka błon mitochondrialnych i znaczenia kardiolipiny – fosfolipidu mitochondrialnego, warunkującego prawidłową morfologię i funkcję wewnętrznej błony mitochondrialnej i występującego w niej łańcucha oddechowego. Zwieńczeniem wstępu pracy jest analiza znaczenia kwasów EPA i DHA dla prawidłowej czynności komórek OUN. Zdaniem Recenzenta, wstęp do pracy doktorskiej w wyczerpujący sposób opisuje

specyficzne aspekty metabolizmu energetycznego astrocytów i płynnie wprowadza czytelnika w podjętą tematykę badawczą. Elementy związane bezpośrednio z tematem pracy są omówione w sposób szczegółowy. Pragnę jednak zaznaczyć, iż co prawda niektóre kluczowe zagadnienia, takie jak wszystkie aspekty metabolizmu energetycznego astrocytów stanowiły konieczny element wstępu, to jednak część tematów mogła być opisana w sposób bardziej skrótowy (np. metabolizm glutaminianu i glutaminy), gdyż nie znajduje bezpośredniego odzwierciedlenia w celach pracy i przeprowadzonych eksperymentach.

Cel podjęcia badań, stanowiący kolejny rozdział doktoratu, sformułowany jest w sposób naturalnie wypływający z informacji zawartych we wstępie. Cel główny – czyli analiza wpływu kwasów DHA i EPA na przeżywalność astrocytów i wybrane aspekty metabolizmu mitochondriów - podzielony jest na szereg celów szczegółowych, do których należą analiza wpływu DHA i EPA na morfologię sieci mitochondrialnej, potencjał mitochondrialny  $\psi_m$ , produkcję reaktywnych form tlenu i azotu, zawartość ATP, kardiolipiny oraz aktywację procesu apoptozy. Przedstawione przez Autora cele szczegółowe zostały w pełni zrealizowane w trakcie realizacji badań i żaden z nich nie został pominięty.

Rozdział Materiały zawiera szczegółowy wykaz odczynników, źródło ich pochodzenia a także skład użytych w doświadczeniach buforów i roztworów. Zawarcie w rozprawie tak szczegółowego opisu wykorzystanych odczynników jest rzadko spotykane i zasługuje na pochwałę. Świadczy także o starannym i przemyślanym przygotowaniu tej części pracy oraz znajomości zastosowanej metodyki.

Rozdział Metodyka zawiera wyczerpujący opis doświadczeń umożliwiający powtórzenie przeprowadzonych eksperymentów. W rozprawie doktorskiej Autor zastosował nowoczesną metodykę, opartą między innymi o sondy fluorescencyjne (np. JC-10, MitoTracker Red CMXRos, H<sub>2</sub>DCF, NAO), cytometrię przepływową, mikroskopię fluorescencyjną, chromatografię gazowo-cieczową czy też bardziej tradycyjne metody takie jak Western Blot. Poszczególne podrozdziały opisujące sposób przeprowadzenia doświadczeń zawierają zwięzły opis mechanizmów biochemicznych na których bazują poszczególne oznaczenia. Ułatwia to ocenę dobrania zastosowanej metodyki do postawionych przez Autora celów pracy. Także część opisująca uzyskanie materiału badawczego jakim były hodowle in vitro astrocytów izolowanych z kory mózgu osesków szczurzych opisano w sposób szczegółowy i umożliwiający powtórzenie samego procesu. Na przeprowadzenie doświadczeń z udziałem zwierząt laboratoryjnych stosowne pozwolenie wydane przez Lokalną Komisję Bioetyczną. Podsumowując, metodologia badawcza zastosowana w recenzowanej rozprawie zapewniła uzyskanie danych o wysokiej jakości.

W rozdziale Wyniki Doktorant szczegółowo opisuje rezultaty poszczególnych eksperymentów, dokonując ciekawych obserwacji odnośnie różnic w oddziaływaniu kwasów EPA i DHA zarówno na astrocyty w hodowli jak i wybrane parametry metabolizmu mitochondrialnego. Doktorant zaobserwował znaczącą inkorporację EPA i DHA do lipidów błon mitochondrialnych, zwiększenie żywotności

astrocytów oraz obniżenie emisji reaktywnych związków tlenu (ROS) i azotu (RNS) w hodowlach niestymulowanych lub stymulowanych  $H_2O_2$  i czynnikiem rozprzegającym mitochondrialny łańcuch oddechowy (CCCP). W powyższych eksperymentach oba kwasy n-3 w podobny, dawkozależny sposób korzystnie wpływały na żywotność astrocytów oraz redukcję emisji ROS i RNS. Kolejne eksperymenty bezpośrednio badające metabolizm mitochondrialny astrocytów wykazały istotnie różne efekty EPA i DHA na zachowanie potencjału mitochondrialnego  $\psi_m$  w warunkach hodowli stymulujących metabolizm glikolityczny (glukoza) lub fosforylację oksydacyjną (galaktoza), także w obecności związku rozprzegającego CCCP. EPA i DHA wykazywały także odmienne działanie na zachowanie potencjału  $\psi_m$  całej sieci mitochondrialnej w astrocytach, wizualizowanej z użyciem sondy MitoTracker Red CMXRos. Co interesujące, pomimo korzystnych efektów obydwu kwasów na polaryzację mitochondriów, Autor nie zaobserwował wzrostu zawartości ATP w komórkach zarówno niestymulowanych jak i po stymulacji związkiem rozprzegającym CCCP. Kolejne doświadczenia uwiaryściły różnice pomiędzy obydwoma kwasami n-3 na aktywację procesu apoptozy oraz zawartość kardiolipiny w mitochondriach.

Kolejny rozdział pracy doktorskiej zawiera podsumowanie wyników oraz dyskusję. Omówienie uzyskanych wyników zostało przeprowadzone w sposób bardzo zwięzły. Autor poruszył i odpowiednio zinterpretował najbardziej kluczowe dane eksperymentalne, takie jak prawdopodobna przyczyna obserwowanych różnic we wpływie EPA i DHA na potencjał mitochondrialny, zawartość kardiolipiny czy wykorzystania glukozy i galaktozy jako substratu energetycznego. Rozprawa nie zawiera podrozdziału wniosków. Jednakże ich rolę może pełnić podsumowanie wyników rozpoczynające dyskusję. Informacje zawarte w podsumowaniu pozwalają stwierdzić, że wszystkie sformułowane uprzednio cele zostały zrealizowane. Do najciekawszych obserwacji zawartych w podsumowaniu zaliczyć można:

- 1) Korzystniejszy wpływ EPA w porównaniu do DHA na zachowanie potencjału mitochondrialnego astrocytów w warunkach rozprzegnięcia ETC przez CCCP.
- 2) Skuteczniejsze hamowanie emisji ROS i RNS przez EPA w porównaniu do DHA w warunkach rozprzegnięcia ETC w mitochondriach astrocytów.
- 3) Podwyższenie poziomu polaryzacji sieci mitochondrialnej astrocytów przez EPA w stosunku do DHA po rozprzegnięciu ETC z użyciem CCCP.
- 4) Spadku liczby apoptotycznych astrocytów oraz hamowanie procesu apoptozy wyznaczonej stosunkiem Bax/Bcl-2 w stopniu wyższym przez EPA niż DHA.

Obserwacje te można uznać za oryginalne osiągnięcie Autora, wnoszące istotny wkład w poznanie mechanizmów korzystnego działania EPA i DHA na funkcjonowanie ośrodkowego układu nerwowego.

## UWAGI I KOMENTARZE

W przedstawionej do recenzji rozprawie doktorskiej Autor dokonał kluczowej obserwacji jaką jest wykazanie różnic w wpływie EPA i DHA na wybrane parametry metabolizmu mitochondrialnego. Otrzymane dane podkreślają istotność poszczególnych kwasów tłuszczowych z grupy n-3, a także ich źródeł pokarmowych na zachowanie prawidłowej funkcji komórek ośrodkowego układu nerwowego i zmniejszenie uszkodzeń oksydacyjnych w obrębie OUN. Interesującym kierunkiem dalszych badań może być analiza wpływu źródła kwasów n-3 różniącego się stosunkiem EPA i DHA na funkcjonowanie mitochondriów w izolowanych astrocytach in-vitro lub zastosowanie podobnego modelu w badaniu czynności poznawczych w zwierzęcym modelu chorób neurozwyrodnieniowych. Z obowiązku recenzenta chciałbym wymienić kilka uwag odnośnie recenzowanej Rozprawy, które w żadnym stopniu nie pomniejszają jej walorów jakościowych.

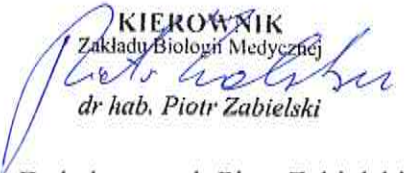
- 1) Metodyka dotycząca analizy składu kwasów tłuszczowych błon mitochondrialnych z użyciem chromatografii gazowo-cieczowej zawiera nieścisłości. Według opisu z rozdziału Metody, lipidy ekstrahowano metodą Folch'a. Następnie separowano w fazie ruchomej n-heptan/eter diizopropylowy/kwas octowy (60:40:3) po uprzedniej transmetylacji kwasów tłuszczowych z użyciem trójfluorku boru ( $\text{BF}_3$ ). Powstałe estry metylowe kwasów tłuszczowych analizowano z pomocą chromatografu gazowo-cieczowego Clarus 500 z detekcją płomieniowo-jonizacyjną (GC/FID). W rozdziale wyniki w opisie składu kwasów tłuszczowych wymieniono natomiast chromatografię gazową z detekcją opartą o spektroskopię mas (GC/MS). W pracy oryginalnej zawierającej część danych eksperymentalnych (Stulczewski, Dawid et al. "EPA stronger than DHA increases the mitochondrial membrane potential and cardiolipin levels but does not change the ATP level in astrocytes." *Experimental Cell Research* vol. 424,1 (2023): 113491) podano tabelaryczne zestawienie wyników bez odniesienia do metodyki ich oznaczania. Zdaniem Recenzenta wymieniona w metodyce mieszanina separacyjna ma zastosowanie w chromatografii cienkowarstwowej (TLC) jako faza ruchoma do rozdziału ekstraktów lipidowych na poszczególne klasy (fosfolipidy (PLs), triacyloglicerole (TAG), estry cholesterolu (CE) i niezestryfikowane kwasy tłuszczowe (NEFA), a nie do separacji estrów metylowych kwasów tłuszczowych powstałych w wyniku transmetylacji z użyciem  $\text{BF}_3$  (Glaser, Claudia et al. "High-throughput analysis of fatty acid composition of plasma glycerophospholipids." *Journal of lipid research* vol. 51,1 (2010): 216-21.) Metodyka wykorzystania GC wymaga zatem uściślenia.
- 2) W opisie wpływu DHA i EPA na skład kwasów tłuszczowych błon mitochondrialnych zawartym w wynikach i podsumowaniu Autor używa określenia zawartość. Jednakże wyniki wyraźnie wskazują, że badany był udział procentowy poszczególnych kwasów w całości lipidów ekstrahowanych z błon mitochondrialnych i poddanych następnie transmetylacji. W tym wypadku nie można używać

stwierzeń, że zawartość danego kwasu zwiększyła lub zmniejszyła się, a jedynie, że zmienił się jego udział procentowy w ogólnej puli kwasów tłuszczowych

- 3) Dyskusja nie zawiera omówienia i interpretacji części bardzo ciekawych wyników jakimi są różnice pomiędzy EPA i DHA w aktywacji procesu apoptozy i regulacji związanych z nim białek. Ta interesująca obserwacja zasługuje na komentarz ze strony Autora.

## UWAGI KOŃCOWE

Podsumowując, uważam, że przedstawiona mi do recenzji Rozprawa Doktorska mgr Dawida Stulczewskiego pt. „Działanie kwasu dokozaheksaenowego i eikozapentaenowego na czynność mitochondriów i przeżywalność astrocytów” jest pracą wartościową pod względem naukowym, wnoszącą nowe elementy poznawcze i praktyczne oraz potwierdza umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Jednocześnie stwierdzam, iż Rozprawa spełnia wszystkie wymagania wyszczególnione w art. 187 ust. 1 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021r., poz. 478 z późn. zm.) i może być skierowana do publicznej obrony. Dlatego też mam zaszczyt przedłożyć Radzie Nauk Medycznych Uniwersytetu Medycznego w Łodzi pozytywną ocenę Rozprawy wraz z wnioskiem o dopuszczenie mgr Dawida Stulczewskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

  
KIEROWNIK  
Zakładu Biologii Medycznej  
dr hab. Piotr Zabielski  
Dr hab. n med. Piotr Zabielski