

Prof. dr hab. Ludmiła Żylińska
Zakład Neurochemii Molekularnej
Katedra Biochemii Medycznej
Uniwersytet Medyczny
ul. Mazowiecka 6/8
92-215 Łódź

Łódź, 02. 05. 2023

Recenzja
rozprawy doktorskiej mgr inż. Wioletty Kazany-Płuski
p.t. „Badania nad mechanizmem działania kompleksu peptydowego yolkina
jako potencjalnego nutraceutyku w prewencji i leczeniu zaburzeń
towarzyszących procesom starzenia”

Od zarania dziejów człowiek poszukuje sposobów na przedłużanie życia, korzystając z bogatego źródła, jakim są substancje występujące w naturze. Szereg zmian w organizmie człowieka zachodzących wraz z wiekiem osłabia nie tylko zdolności fizyczne, lecz przede wszystkim obniża zdolności intelektualne. Choć starzenie organizmu jest fizjologicznym, wieloetapowym procesem, zaś jego biologiczny początek rozpoczyna się już koło 35 roku życia, sam przebieg zachodzi u każdego człowieka w odmienny sposób. Wiadomym jest, że oprócz predyspozycji genetycznych, bardzo istotny wpływ odgrywa wiele czynników, w tym tryb i warunki życia oraz dieta. Nic dziwnego, że już od wieków produkowano i stosowano naturalne składniki hamujące starzenie się organizmu, a wraz z rozwojem nauki i metod badawczych, poznawano mechanizmy poprzez które możliwe jest osłabianie i opóźnianie niekorzystnych efektów starzenia. Mimo że natury nie da się do końca oszukać, faktem jest, że nie tylko granicę długości życia daje się przesunąć coraz dalej, ale także jego jakość ulega poprawie. Szczególne zainteresowanie budzą substancje, zaliczane do nutraceutyków, które zwiększają ochronę komórek nerwowych przed chorobami neurodegeneracyjnymi oraz takie, które potencjalnie redukują uszkodzenia tkanki mózgowej poprzez wzrost nowych neuronów, aktywując czynniki wzrostu nerwów w komórkach mózgowych.

W ten obszar poszukiwań włączył się już wiele lat temu zespół kierowany przez Prof. Antoniego Polanowskiego, uznanego na świecie specjalistę w dziedzinie chemii białek, zwłaszcza takich, które mogą mieć zastosowanie w biotechnologii i medycynie. Jednym z kierunków badań zespołu było wykazanie obecności immunomodulujących substancji o niskiej masie cząsteczkowej związanych z immunoglobuliną Y (IgY) pochodzących z jaja kurzego. Ponadto wykazano, że preparaty żółtkowe wyizolowane z jaj różnych gatunków ptaków wykazują duże podobieństwo w składzie polipeptydowym oraz silne działanie modulujące, porównywalne z żółtkiem jaja kurzego. Sugeruje to jego ważną funkcję biologiczną dla zarodka, umożliwiając prawidłowy rozwój i ochronę przed infekcjami bakteryjnymi i wirusowymi. Bardzo cennym odkryciem zespołu było wykazanie w 2012 r. aktywności biologicznej kompleksu peptydów z żółtka jaj, będących produktem proteolitycznej degradacji przez katepsynę witellogeniny II, który nazwano yolkiną.

Jest to mieszanina kilku polipeptydów i peptydów o masie cząsteczkowej od 1,0 do 35 kDa, posiadających m. in. zdolność indukowania sekrecji cytokin, aktywacji produkcji tlenu azotu oraz hamowania komórkowych procesów utleniania lipidów. Zaobserwowano również, że ten endogeny regulator układu odpornościowego odgrywa ważną rolę w modulacji funkcji ośrodkowego układu nerwowego. Yolkiną wykazuje bowiem właściwości prokognitywne, wpływając na prawidłowe funkcjonowanie pamięci przestrzennej i epizodycznej młodych i starych szczurów, prezentujących zmiany neurodegeneracyjne.

Kontynuacja badań nad yolkiną stała się podstawą rozprawy doktorskiej mgr inż. Wioletty Kazany-Płuszki pod kierunkiem dr hab. prof. nadzw. Agnieszki Zabłockiej. Głównym celem pracy była analiza molekularnych mechanizmów działania kompleksu yolkiny na proces wydzielania białka BDNF oraz zaangażowanie specyficznych szlaków sygnalizacyjnych aktywujących czynnik CREB, kluczowy regulator ekspresji *Bdnf*. Oceniano także zdolności antyoksydacyjne yolkiny oraz potencjalny wpływ na toksyczne działania agregatów A β 1-42. Jako model badawczy wybrano linię komórkową PC12-Tet-On wywodzącą się ze szczurzego guza chromochłonnego nadnerczy. Te komórki neuroektodermalnego pochodzenia w odpowiedzi na czynnik wzrostu nerwów (NGF) wykazują zdolność do fenotypowego różnicowania się w komórki podobne do neuronów współczulnych. W celu potwierdzenia specyficznych właściwości yolkiny uzyskanych dla komórek PC12, zastosowano także drugą linię komórkową H19-7, którą stanowią nieśmiertelnione komórki prekursorowe hipokampa szczura.

Rozprawa mgr inż. Wioletty Kazany-Płuszki jest klasyczną dysertacją obejmującą 127 stron. Na 28 stronach „Wstępu” przedstawiono teoretyczne podstawy badanej problematyki obejmujące opis zmian w OUN w procesie starzenia, wybrane czynniki o szczególnie neuropatologicznym działaniu, a także fizjologiczne mechanizmy wspomagające neuroprotekcję. Podana jest także bardzo szczegółowa charakterystyka yolkiny. To wprowadzenie uzupełnione zostało 10 rycinami, ze szczególnym uwzględnieniem szlaków sygnalizacyjnych, które w wyrazisty sposób obrazują zagadnienia analizowane przez Doktorantkę.

Na kolejnych 20 stronach rozprawy w „Materiałach i metodach” opisana jest metodyka stosowana w pracy, przy czym należy podkreślić, że korzystano z wielu najnowszych technik w zakresie biologii molekularnej, chromatografii, spektrometrii mas, technik fluorescencyjnych, mikroskopii świetlnej i elektronowej, oznaczeń biochemicznych oraz metod immunologicznych. Kolejny rozdział „Wyniki” zawiera rezultaty opisane na 33 stronach, udokumentowane w postaci 28 rycin. Badania Doktorantki obejmowały 2 główne etapy. Pierwszy, to prace prowadzone na linii komórkowej PC12, drugi natomiast obejmował analizy wykonane na linii komórkowej H19-7. Do najistotniejszych obserwacji należy zaliczyć:

- wykazanie stymulującego działania yolkiny na produkcję mBDNF w obu badanych liniach komórkowych,
- udział yolkiny w aktywacji szlaków PI₃K/AKT oraz cAMP/PKA w aktywacji czynnika transkrypcyjnego CREB, regulującego poziom ekspresji *Bdnf*,

- wykazanie potencjału yolki do obniżania poziomu ROS oraz zwiększania ekspresji izoform dysmutazy ponadtlenkowej,
- przedstawienie hamowania przez yolkinę procesu agregacji białka A β 1-42.

Należy podkreślić, że w przeprowadzonych badaniach zastosowano wiele dobrze przemyślanych układów kontrolnych, w tym specyficznych inhibitorów oraz markerów, pozwalających na uzyskanie precyzyjnej i wiarygodnej odpowiedzi, zaś bardzo szczegółowy opis metod oraz rzetelna dokumentacja naukowa wyników potwierdza wagę uzyskanych rezultatów.

Na 12 stronach „Dyskusji” mgr inż. Wioletta Kazana-Płuszka konfrontuje uzyskane wyniki z dostępnymi danymi literaturowymi, choć przyznać należy, że yolki zaczyna być dopiero podmiotem zainteresowania naukowców. Z 301 pozycji literaturowych jedynie nieliczne dotyczą yolki. Tym bardziej wyniki uzyskane przez Doktorantkę otwierają nowy rozdział w poznawaniu potencjału tego kompleksu peptydowego. Poznanie molekularnych mechanizmów działania yolki może znaleźć praktyczne zastosowanie, zwłaszcza w kontekście przeciwdziałania procesom starzenia komórek nerwowych, aktywacji naturalnych systemów antyoksydacyjnych, a także ingerencji w formowanie toksycznych agregatów amyloidowych. Choć raczej nie można nazywać żółtka jaja „cudownym eliksirem życia”, wiele wskazuje na możliwość skutecznego wspomaganie procesów zdrowego starzenia, chociażby ze względu na wysoką bioprzyswajalność jego naturalnych składników.

Z obowiązku recenzentki muszę wspomnieć o kilku zauważonych nieścisłościach oraz uwagach do rozprawy, a mianowicie:

1. Wykaz skrótów:

- rozwinięcie skrótu CAT po ang, to *catalase*

2. Wstęp:

- (str. 18) „procesowanie APP” - może lepszym określeniem jest formowanie
- (str. 29) „ekspresjonowanie” - chyba lepiej użyć „uleganie ekspresji”
- (str. 31) „jony Ca²⁺” - albo jony wapnia, albo Ca²⁺
- (str.31) „receptory GPC” - trochę dziwny twór, używałabym jednak formy GPCR

3. Wyniki

- Stosowanie terminu „komórki neuropodobne” do linii PC12 można jedynie wtedy, gdy są one różnicowane NGF lub/i db-cAMP. Linia nieróżnicowana to fenotypowo w zasadzie komórki wydzielnicze, bez całego kompletu aktywnych genów, charakterystycznych dla neuronów. Zatem w niektórych doświadczeniach różnicowane NGF komórki PC12 nie są zbyt dobrą kontrolą pozytywną dla nieróżnicowanych komórek stymulowanych yolkiną.
- W opisie legend dotyczących wyników przedstawionych na wykresach nieprawidłowo opisano zmienne zależne i niezależne (zmienną niezależną był czas). Dotyczy to rycin 7.5-7.8, 7.10 - 7.14, 7.22, 7.23, 7.25 - 7.28.

- (Str. 83) W opisie podany jest 5-dniowy czas różnicowania PC12 w obecności NGF, natomiast w „Materiałach i metodach” podano, że wynosił 7 dni (str. 53).

Powyższe uwagi dotyczące niezbyt zręcznych sformułowań, błędów napotkanych w tekście oraz pozostałe komentarze nie umniejszają nowatorstwa rozprawy doktorskiej, która niewątpliwie stanowi inspirację do prowadzenia dalszych badań.

Podsumowując, w mojej ocenie mgr inż. Wioletta Kazana-Płuszka podjęła bardzo interesujący i perspektywiczny temat, zrealizowała postawione sobie cele badawcze dobierając warsztat metodyczny zgodny ze standardami stosowanymi w tej dziedzinie nauki i wykazując znakomite przygotowanie merytoryczne. Przedstawiona mi do oceny praca spełnia wszystkie kryteria stawiane rozprawom doktorskim 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), dlatego z przyjemnością przedstawiam wniosek Wysokiej Radzie Naukowej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda PAN we Wrocławiu o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie mgr inż. Wioletty Kazany-Płuszki do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie uwzględniając fakt, że większość przedstawionych wyników została opublikowana w czasopismach o międzynarodowym zasięgu i wysokim współczynniku oddziaływania wnoszę o wyróżnienie rozprawy.

Leokadia Zylinska