



PAN - Instytut Immunologii  
Wpł. dnia 24-05-2023.....  
L.dz. 140.....

**UNIwersYTET MEDYCZNY**  
IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH WE WROCLAWIU

WYDZIAŁ LEKARSKI  
Katedra Biochemii i Immunochemii  
Dr hab. Jadwiga Pietkiewicz

Wrocław, 15-05-2023

RECENZJA

Rozprawy doktorskiej mgr inż. Wioletty Kazany-Płuszki

pt. „**Badania nad mechanizmem działania kompleksu peptydowego yolkina jako potencjalnego nutraceutyku w prewencji i leczeniu zaburzeń towarzyszących procesom starzenia**”

Praca wykonana w Laboratorium Immunobiologii Mikrobiomu Instytutu Immunologii i Terapii  
Doświadczalnej PAN

Promotor rozprawy - dr hab. Agnieszka Zabłocka

**Ocena wyboru tematu badań**

Przekazana do oceny rozprawa doktorska mgr inż. Wioletty Kazany-Płuszki jest monografią, w której scharakteryzowano właściwości yolkiny - kompleksu peptydowego o wielokierunkowej aktywności biologicznej, w celu wykazania jej użyteczności jako czynnika neuroprotekcijnego.

Dysfunkcje ośrodkowego układu nerwowego w trakcie starzenia dotyczą pogarszania wraz z wiekiem homeostazy tkanki mózgowej i na ogół wiązane są ze zmniejszaniem plastyczności neuronów kory mózgowej i hipokampa. Regiony te są ważne dla funkcji lokomotorycznych i poznawczych.

W kontroli tych procesów na poziomie komórkowym udział ma czynnik białkowy BDNF (neurotroficzny czynnik pochodzenia mózgowego). Jest to główna neurotrofina wytwarzana przez komórki nerwowe, kluczowa w ich prawidłowym rozwoju, proliferacji i przetrwaniu. Ma znaczenie w ochronie komórek przed apoptozą, stresem oksydacyjnym, kumulacją złogów amyloidu A $\beta_{1-42}$ . BDNF pełni ważną rolę w kontroli plastyczności synaptycznej, uczenia się, tworzenie pamięci, a przez to jest istotnym czynnikiem chroniącym ustrój przed zaburzeniami poznawczymi nasilonymi w procesie starzenia.

Regulację transkryptu BDNF kontrolują i/lub modulują różne czynniki, w tym aktywność fizyczna, leki przeciwdepresyjne, substancje wpływające na aktywność neuronów, chroniczny stres oraz hormony, takie jak estrogeny.

W zmianach poznawczych związanych ze starzeniem się, chorobami neuropsychiatrycznymi i neurodegeneracyjnymi wskazane jest nasilenie produkcji BDNF. W stymulacji komórek układu nerwowego do wytwarzania BDNF mogą być użyteczne m.in. substancje pochodzenia naturalnego.

W pracy doktorskiej odkryto nowe funkcje yolki - kompleksu peptydowego wydzielonego z żółtek jaj kurzych. Wykazano jej ochronny i regulacyjny wpływ na komórki nerwowe, co może wskazywać na możliwość jej wykorzystywania jako nutraceutyka pomocnego w niwelowaniu skutków starzenia organizmu, a także łagodzenia chorób neurodegeneracyjnych.

Badania objęte tematem pracy doktorskiej zostały zrealizowane w oparciu o bogaty zestaw nowoczesnych metod z zakresu biologii molekularnej, mają charakter podstawowy, ale otwierają ważne możliwości aplikacyjne w praktyce klinicznej.

Podjęta tematyka wywodzi się z dorobku zespołu Laboratorium Immunobiologii Mikrobiomu Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN i jest efektem wieloletnich prac promotora rozprawy – dr hab. Agnieszki Zabłockiej, badającej procesy neurodegeneracji, neuroprotekcji, mechanizmy kontrolujące ścieżki sygnałowe w tych procesach, a także zajmującej się poszukiwaniami czynników biologicznych atrakcyjnych w terapii chorób neurodegeneracyjnych oraz w łagodzeniu skutków starzenia ustroju.

### **Opis formalny**

Rozprawa doktorska mgr inż. Wioletty Kazany-Płuszki ma układ typowy dla prac tego rodzaju. Całość opracowania obejmuje 127 stron tekstu wraz z 39 rysunkami i 8 tabelami, podzielonego na 11 rozdziałów, co jest dużym ułatwieniem w prześledzeniu zawartych treści.

Na początku umieszczono wykaz skrótów oraz streszczenie w polskiej i angielskiej wersji językowej. Kolejne rozdziały zawierają wstęp teoretyczny, cel pracy, wykaz materiałów, część metodyczną, wyniki, dyskusję i wnioski końcowe oraz wykaz piśmiennictwa i dorobek naukowy Doktorantki.

Wstęp teoretyczny zawarty na 29 stronach został podzielony przejrzysto na 7 podrozdziałów i jest obszernym wprowadzeniem w tematykę uzasadniającym cel podjętych badań, który przedstawiony w kolejnej części manuskryptu. Opis wykorzystanych materiałów i omówienie metodyki ujęty w 27 podrozdziałach zajmuje kolejne 21 stron manuskryptu. Wyniki wykonanych badań omówiono na dalszych 34 stronach dysertacji. Dla lepszej czytelności część ta została podzielona na 13 podrozdziałów. Najważniejsze problemy naukowe rozprawy Doktorantka omawia w dyskusji rozwiniętej na kolejnych 14 stronach. Wnioski końcowe podane są w następnej części tekstu. Rozprawę kończy bibliografia (301 pozycji) oraz wykaz dorobku naukowego Doktorantki.

Warto w tym miejscu podkreślić że w wyniku działalności badawczej Doktorantki ukazało się w latach 2018-2023 dziewięć prac naukowych, w tym 8 pozycji w angielskojęzycznych czasopismach o wysokim współczynniku wpływu oraz 1 praca w wydawnictwie polskim. W czterech z tych publikacji mgr inż. Wioletta Kazana-Płuszka jest pierwszym autorem.

Wyniki objęte tematyką pracy doktorskiej zostały częściowo opublikowane w 3 wymienionych pracach.

Ponadto wyniki badań związane z tematyką pracy doktorskiej były prezentowane na 5 konferencjach międzynarodowych. Autorka jest laureatką czterech nagród i wyróżnień za osiągnięcia naukowe, odbyła w 2019 roku staż naukowy w Laboratorium Neurobiologii Eksperymentalnej w Czeskim Narodowym Instytucie Zdrowia Psychicznego

Mam dwie uwagi dotyczące formalnej budowy ocenianej rozprawy. Pierwsza dotyczy braku na końcu opracowania pełnego wykazu rysunków i tabel (numery i tytuły) – to ułatwiłoby czytelnikowi orientację w zawartości materiału ilustrującego i dokumentującego wyniki.

Druga uwaga dotyczy źródeł finansowania podjętych badań. Powinna być podana informacja o środkach na realizację tak obszernych zadań badawczych. Wprawdzie w dorobku Doktorantki jest

wskazany projekt NCBiR z lat 2020-2022, w którym brała udział jako wykonawca, ale tematyka w nim realizowana dotyczyła szczepionki przeciwko wirusowi SARS-CoV2.

### **Charakterystyka i ocena merytoryczna**

**Tytuł pracy** doktorskiej jest zgodny z zakresem wykonanych badań i prawidłowo odzwierciedla zawartość rozprawy.

We **Wstępie** Autorka wprowadza do tematyki, a to pozwala dobrze uzasadnić cel podjętych badań.

W części teoretycznej opisuje proces starzenia w aspekcie zmian ośrodkowego układu nerwowego, omawia wpływ stresu oksydacyjnego na starzenie mózgu, wskazuje na rolę amyloidu  $A\beta_{1-42}$  w zmianach patologicznych tkanki mózgowej, opisuje neurogenezę w organizmie dorosłego człowieka i udział różnych czynników w kontroli procesów proliferacji, różnicowania i przeżywalności nowo powstających komórek.

W grupie czynników kontrolnych wskazuje na szczególną i główną rolę regulacyjną neurotrofiny BDNF – czynnika neurotroficznego pochodzenia mózgowego, opisuje mechanizmy kontrolujące ekspresję tego białka, jego uwalnianie, funkcje, skutki niedoborów.

Kolejna część Wstępu to obszerna charakterystyka białek receptorowych pobudzanych specyficjnie przez BDNF oraz szczegółowe omówienie kaskad sygnałowych aktywujących czynnik transkrypcyjny CREB (czynnik transkrypcyjny aktywowany w odpowiedzi na cAMP). Pojawia się w tym fragmencie tekstu specyficzny dla BDNF receptor błonowy TrkB (str. 24) należący do rodziny receptorowych kinaz białkowych tyrozyno-specyficznych. Tu z obowiązku recenzenta nadmieniam, że w wykazie użytych skrótów podana jest nieprawidłowa nazwa Trk jako receptor kinazy związanej z tropomiozyną.

Doktorantka słusznie wskazuje na decydujący wpływ czynnika BDNF na funkcjonowanie mózgu, ponieważ jest on kluczowym elementem kontrolującym przeżywalność i różnicowanie neuronów, procesy synaptogenezy, neurogenezy.

Warto podkreślić w tym miejscu bardzo interesujące omówienie szlaków sygnałowych aktywujących czynnik CREB i graficzną ilustrację tych mechanizmów na rys. 4.5 oraz 4.6. Opis oparty jest o aktualne doniesienia literaturowe i znakomicie uzupełnia dostępną w podręcznikach klasyczną wiedzę na ten temat. Ale muszę w tym miejscu wskazać na niezręczne sformułowanie w opisie rysunku 4.5 (str. 28 Wstępu):

zdanie

...”Neuroprzekaźniki, ligandy, czynniki wzrostu i induktory stresu powodują wzrost wewnątrzkomórkowego poziomu wapnia przez kanały jonowe lub bramkowane ligandem ...”

jest nieprawidłowo sformułowane, ponieważ chodzi o otwarte kanały jonowe lub bramkowane ligandem, a nie same jako takie; ponadto poziom cAMP nie wzrasta w wyniku aktywacji receptorów RTK.

Bardziej zrozumiałymi byłyby opis tego rysunku po przereklamowaniu tekstu np. w taki sposób:

Neuroprzekaźniki, ligandy, czynniki wzrostu i induktory stresu powodują aktywację receptorów RTK, receptorów sprzężonych z białkami G, wywołują otwieranie kanałów jonowych lub bramkowanych ligandem. Skutkiem tego jest wzrost wewnątrzkomórkowego poziomu cAMP, jonów wapnia.

W ostatniej części Wstępu Doktorantka opisuje krótko nutraceutyki, po czym przedstawia aktualny stan wiedzy dotyczący yolkiny.

Wstęp teoretyczny napisany jest rzeczowo, przystępnie i stanowi właściwie wyselekcjonowany i zarazem obszerny kompleks wiedzy niezbędny dla uświadomienia czytelnikowi potrzeby i znaczenia zaplanowanych badań. Warto podkreślić, że Doktorantka wykazała dużą umiejętność trafego wyboru

cytowanej literatury. Na aktualność tych pozycji wskazuje chociażby wskaźnik procentowy ilości cytowanych prac z ostatnich pięciu lat – stanowią one ok. 40% wszystkich przytoczonych publikacji.

Na uwagę zasługuje własne opracowanie bardzo dobrze przemyślanych ilustracji zamieszczonych w tej części rozprawy, co świadczy o rzetelnym zapoznaniu się Autorki z tematyką badań i imponującym przyswojeniu wiedzy pochodzącej z aktualnych doniesień literaturowych.

W teoretycznej części pracy Autorka przedstawiła kluczowe zagadnienia istotne w ocenie i interpretacji uzyskanych wyników badań. Ponadto podane we Wstępie informacje pozwalają czytelnikowi dobrze zrozumieć założenia i cel pracy.

**Założenia i cel pracy** zostały sformułowane prawidłowo, w sposób jasny i jednoznaczny. Wyznaczenie sześciu zadań szczegółowych wskazuje na szeroki zakres zaplanowanych badań, zmierzających do wykazania potencjalnych możliwości yolkiny jako nutraceutyka użytecznego w poprawie funkcjonowania komórek nerwowych.

Zdaniem recenzenta zbędne jest jednak długie wprowadzenie, ponieważ informacje w nim zawarte już podano wcześniej w punkcie 4.7 Wstępu na str. 37, pojawią się też w Dyskusji na str. 96.

Do uzasadnienia założeń pracy wystarczyłoby pozostawić z tego fragmentu tekstu ostatnie zdanie: ... „Do tej pory nie poznano dokładnego mechanizmu działania yolkiny w regulacji .....

#### **Materiały i metody.**

W pierwszej części tego rozdziału Doktorantka podała czytelny wykaz używanych odczynników z bardzo pomocnymi tabelami przedstawiającymi zestawy firmowe reagentów i ich źródła. W kolejnej obszernej tabeli Autorka opisała przeciwciała potrzebne w immunodetekcji jakościowej i ilościowej badanych białek. Przedstawiła klarowny opis 2 typów linii komórkowych wybranych do badań.

Godna uznania jest różnorodność metod badawczych i zastosowanych technik laboratoryjnych.

Jest to bogaty zestaw nowoczesnych metod i najnowszych technik użytecznych w biologii molekularnej, analizach biochemicznych i immunochemicznych. Jednak opis niektórych metod nie ma podanych odnośników literaturowych. Na podstawie jakich prac źródłowych ustalano warunki badania aktywności przeciwutleniających yolkiny, opisane w punkcie 6.23, 6.24 oraz 6.25?

Warto podkreślić, że realizacja wymienionych w celach pracy doktorskiej szeregu złożonych zadań jest czasochłonna, wymaga dużych nakładów pracy nie tylko na wykonanie eksperymentów, ale także na przygotowanie procedur. Sądzę, że były to dla Doktorantki duże wyzwania, ale uzyskane rezultaty wskazują na jej wielką pracowitość i bardzo dobre przygotowanie warsztatowe.

**Wyniki.** Doktorantka podzieliła konsekwentnie tą część dysertacji na podrozdziały, w których opisała rzeczowo i jasno rezultaty doświadczeń oraz przedstawiła je na 39 ilustracjach oraz w trzech tabelach czytelnie skonstruowanych i jasno opisanych.

Ze względu na fakt, że część wyników objętych tematem pracy doktorskiej ukazała się już w formie publikacji w czasopiśmie o znaczących IF i były one oceniane przez recenzentów tych czasopism, mam w pewnej części ułatwioną ocenę rozprawy mgr inż. Wioletty Kazany-Płuski.

W tym miejscu postawię jednak kilka pytań dotyczących dokumentacji wyników:

1. Na Rys. 7.11 ilustrującym wpływ yolkiny na aktywację kinazy AKT w komórkach PC<sub>12</sub> wykazano, że fosforylacja reszty Ser<sub>473</sub> w AKT po 60 minutach inkubacji z yolkiną wzrasta 1,65-krotnie w porównaniu z efektem zachodzącym w kontrolnych komórkach nie poddawanych stymulacji. Jednak na immunoblocie prążek fosfo-AKT w 60 minucie inkubacji nie różni się intensywnością w porównaniu z kontrolnym pasmem w niestymulowanych komórkach, ani w komórkach krócej inkubowanych z yolkiną. Jak Autorka wyjaśni tę rozbieżność?

2. W komórkach PC<sub>12</sub> oceniano wpływ yolki na poziom ROS i określono jej zdolności w pobudzaniu systemu obrony antyoksydacyjnej.

Dlaczego nie badano tych efektów w komórkach H<sub>19-7</sub>?

3. Specyficzność działania yolki na określone elementy kaskad sygnalizacyjnych można potwierdzić po preinkubacji komórek z inhibitorami swoistymi dla receptorów błonowych lub działających na wybrane ogniwa ścieżki sygnałowej. W publikacjach zespołu Laboratorium Immunobiologii Mikrobiomu były takie efekty badane. W tym kontekście można znaleźć pewne interesujące dane również w świeżo opublikowanej w 2023 w *Molecular neurobiology* pracy Autorki i współpracowników [ref. 280]. Proszę o komentarz na ten temat, ponieważ poszerzałby on przedstawione w rozprawie rezultaty.

Godne uwagi jest, że Doktorantka wydzieliła yolkę, oceniła jej stabilność, określiła jej homologię do witellogeniny I i II - prekursorów większości białek w żółtku jaj kręgowców i bezkręgowców. Wykazała, że preparat jest wolny od zanieczyszczeń mikrobiologicznych i nie wykazuje aktywności cytotoksycznej wobec komórek PC<sub>12</sub>, a w przypadku komórek H<sub>19-7</sub> nawet wywiera korzystny wpływ na ich żywotność. Cechy te wskazują na biogodność uzyskanego kompleksu peptydowego i gwarantują, że obserwowane w badaniach komórkowych efekty nie są obciążone błędami jakie mogłaby generować yolka niestaranie wyizolowana.

Istotnym osiągnięciem Autorki jest wykazanie, że yolka to bezpieczny czynnik dla komórek neuronalnych również dlatego, że sama nie generuje stresu oksydacyjnego, ale jest zdolna do wzmocnienia tarczy antyoksydacyjnej poprzez nasilenie produkcji dysmutazy ponadtlenkowej. Pełni więc rolę ochronną w komórkach nerwowych niwelując stres oksydacyjny.

Warto podkreślić, że Doktorantka wykazała zdolności yolki do hamowania agregacji amyloidu A $\beta$ <sub>1-42</sub> w komórkach nerwowych. W obecności yolki zmniejsza się efekt cytotoksyczny amyloidu, ponieważ oddziałuje ona z monomerami A $\beta$ <sub>1-42</sub> utrudniając agregację.

Kojnym oryginalnym i istotnym odkryciem Autorki jest wykazanie ważnej roli yolki w nasileniu produkcji neurotrofiny BDNF w neuropodobnych komórkach PC<sub>12</sub> i w H<sub>19-7</sub> - unieśmiertnionych komórkach prekursorowych hipokampa. Identyfikacja ścieżek sygnałowych aktywowanych w obecności yolki oraz wykazanie aktywacji czynnika CREB pobudzającego ekspresję genu *Bdnf* stanowi kluczowe osiągnięcie doktorantki i jest ukoronowaniem jej pracy.

Bardzo interesujące są również obserwacje zmian morfologicznych komórek H<sub>19-7</sub> traktowanych yolką, tzn. zmiana ich kształtu i tworzenie wypustek nerwowych. Doktorantka sugeruje, że za to może odpowiadać dojrzała forma BDNF produkowana w stymulowanych yolką komórkach, która po wydzieleniu do przestrzeni pozakomórkowej może wiązać się specyficznie z receptorem TrkB, w jaki wyposażone są komórki H<sub>19-7</sub>. Efektu takiego nie wykazywały komórki PC<sub>12</sub> prawdopodobnie ze względu na brak receptorów TrkB na ich powierzchni. Ta interesująca hipoteza jest godna uwagi i warta dalszych badań.

**Dyskusja.** Nie mam uwag krytycznych do kolejnego rozdziału – dyskusji wyników. Autorka bardzo trafnie zinterpretowała uzyskane rezultaty. Przeanalizowała je wnikliwie i kompleksowo w oparciu o 125 pozycji dobrze wybranych cytowań aktualnej literatury światowej, w tym również prac własnych. Warto podkreślić dużą umiejętność krytycznej oceny uzyskanych wyników. To potwierdza, że Doktorantka jest bardzo dobrze wprowadzona w temat, posiada dużą wiedzę i umiejętności trafnej oceny i interpretacji uzyskanych rezultatów.

**Wnioski.** Umieszczone po Dyskusji wnioski końcowe budzą pewną obawę. Zostały wyszczególnione w 7 punktach, ale są w gruncie rzeczy wymienieniem osiągniętych wyników. Powinny być bardziej uogólnione. Brakuje w tym miejscu wyraźnego nawiązania do tytułu pracy i zamierzonego celu badań, czyli uwypuklenia doniosłości odkrycia nowej roli yolki i jej potencjalnego znaczenia jako nutraceutyka o własnościach neuroprotektoryjnych.

**Bibliografia.** Z obowiązku recenzenta wskazuję jeszcze na pewne uchybienia w wykazie cytowań. Wprawdzie warto docenić, że w piśmiennictwie cytowanym znajdują się w większości prace wydane w międzynarodowych czasopismach o uznanej randze międzynarodowej, to wykaz bibliograficzny zredagowany jest niejednorodnie.


1. Podana w wykazie w pozycji 245 publikacja nie jest zawarta w tekście opracowania.
2. Styl zapisu poszczególnych pozycji literaturowych jest niejednolity. W celu uniknięcia pewnego nieporządku Autorka powinna była przyjąć jedną konwencję, np. harwardzki system cytowania literatury.

Te krytyczne uwagi nie umniejszają wartości pracy doktorskiej mgr inż. Wioletty Kazany-Płuszki. Warto podkreślić, że rozprawa ma charakter nowatorski i wnosi istotne oryginalne wartości do wiedzy o mechanizmach odpowiedzialnych za funkcjonowanie komórek w ośrodkowym układzie nerwowym podczas starzenia organizmu. Poszerza wiedzę o czynnikach naturalnych, użytecznych w niwelowaniu niekorzystnych zmian systemu nerwowego w starzejącym się ustroju. Stanowi to dobrą podstawę do dalszych badań nad użytecznością nutraceutyków w łagodzeniu behawioralnych objawów starzenia i w poprawie funkcji poznawczych poprzez stymulację procesów uczenia się i pamięci.

Podsumowując, w mojej ocenie praca jest wartościowa, badania zostały prawidłowo zaplanowane i zrealizowane. Uważam, że założony cel rozprawy doktorskiej został osiągnięty, a rezultaty stanowią ważny wkład w aktualny stan wiedzy obejmujący dyscyplinę nauki biologiczne. Warto dodać, że dodatkowym atutem wykonanej pracy jest to, iż wyniki uzyskane w tych badaniach podstawowych dają możliwość wykorzystania zdobytej wiedzy w praktyce klinicznej. Uważam, że przedłożona mi do oceny dysertacja zawiera oryginalny materiał doświadczalny i spełnia wszystkie stawiane rozprawom doktorskim kryteria określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 roku Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478, ze zm.).

Przedstawiam więc Radzie Naukowej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu pozytywną ocenę rozprawy oraz wnioskuję o dopuszczenie mgr inż. Wioletty Kazany-Płuszki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie, z uwagi na wysoką wartość merytoryczną pracy i jej nowatorski charakter składam wniosek o wyróżnienie rozprawy doktorskiej.

  
.....

Dr hab. Jadwiga Pietkiewicz

Katedra Biochemii i Immunochemii  
Zakład Biochemii Lekarskiej  
Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu