



UNIWERSYTET MEDYCZNY IM. KAROLA MARCINKOWSKIEGO W POZNANIU

## Zakład Genetyki w Psychiatrii

### Katedry Psychiatrii

Kierownik: dr hab. n. med. Joanna Pawlak

ul. Rokietnicka 8, 60-806 Poznań

ul. Szpitalna 27/33, 60-572 Poznań

tel. +48 61 8547 640, +48 61 8547 641

fax. +48 61 8547 663

Instytut Immunologii  
Wpł. dnia 12.05.2023  
Licz. 127

Dr hab. n. med. Joanna Pawlak

Poznań, dnia 5.05.2023 r.

Zakład Genetyki w Psychiatrii

Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

### **Recenzja pracy doktorskiej mgr inż. Wioletty Kazany-Pluszki pt.:**

### **Badania nad mechanizmem działania kompleksu peptydowego yolkina jako potencjalnego nutraceutyku w prewencji i leczeniu zaburzeń towarzyszących procesom starzenia**

**Promotor: dr hab. Agnieszka Zabłocka**

Rozumienie procesów starzenia i jakość życia osób w wieku podeszłym nabierają we współczesnym społeczeństwie krajów rozwiniętych coraz większego znaczenia. Medycyna efektywnie rozwija metody pozwalające na przedłużenie życia, jednak tzw. udane starzenie się pozostaje celem trudnym do osiągnięcia. Rozwój wiedzy z zakresu dietetyki i pewien renesans w poglądach na wiedzę ludności rdzennej (ang. indigenous peoples) inspirowane do korzystania z czynników prozdrowotnych, do których mamy dostęp w naturalnym środowisku i życiu codziennym. Cel trzeci na liście Celów Zrównoważonego Rozwoju UNESCO brzmi „Zapewnić zdrowe życie i promować dobre samopoczucie dla wszystkich w każdym wieku” (ang.: „Ensure healthy lives and promote well-being for all at all ages”). Cel czwarty wzywa między innymi do promowania uczenia się przez całe życie (ang. life-long learning”). Przedstawiona praca doskonale wpisuje się w realizację tych wyzwań przez wkład w nową wiedzę o kompleksie peptydowym yolkina w kontekście starzenia się mózgu.

Przedłożona do recenzji praca ma formę monografii w języku polskim. Liczy 127 stron i obejmuje następujące rozdziały: Wstęp; Cel pracy; Materiały i metody; Wyniki; Dyskusja i Wnioski. Uzupełniają ją także streszczenie w języku polskim i angielskim, wykaz

skrótów, piśmiennictwo i wyszczególnienie dorobku naukowego. W tym ostatnim Doktorantka wskazuje trzy publikacje (dwie badawcze i jedną pogładową, w czasopismach z IF), w których zamieszczono częściowo przesłanki teoretyczne i wyniki omówione w monografii.

Doktorantka rozpoczęła rozprawę od omówienia podstawowych zagadnień dotyczących budowy, funkcji i procesów starzenia się ośrodkowego układu nerwowego. Opisała czynniki powodujące starzenie się mózgu oraz widoczne w nim zmiany. Szczególną uwagę poświęciła roli reaktywnych form tlenu i peptydów amyloidu  $\beta$ . Zestawiła te zagadnienia z opisem ekspresji i funkcji neurotrofin i ich receptorów, zwłaszcza BDNF (neurotroficznego czynnika pochodzenia mózgowego).

Następnie zwróciła uwagę na niedobory BDNF oraz ścieżki regulujące jego syntezę. W tym miejscu pojawiło się sformułowanie: „...białka BDNF, które często pełni dla tych chorób funkcję biomarkera” (str.25). W odniesieniu do chorób i zaburzeń psychicznych poszukiwania biomarkerów są szczególnie intensywne ze względu na potrzebę obiektywizacji kryteriów rozpoznawczych. Faktycznie BDNF jest badany w takich analizach i istnieją dane świadczące o jego roli w etiopatogenezie objawów, jednak wydają się one nie dość jednoznaczne i mało specyficzne, by w pełni zaliczyć ten czynnik do biomarkerów swoistych dla określonej diagnozy.

Ostatnim elementem wprowadzenia jest podrozdział poświęcony nutraceutykom oraz podsumowanie dotychczasowej wiedzy o właściwościach kompleksu peptydowego yolkina.

Na stronie 42 znajduje się opis celu rozprawy doktorskiej. Sformułowano go w sposób, który powtarza główne stwierdzenia z części wprowadzającej i następnie wymienia etapy badań. W mojej ocenie najtrafniej cel pracy ujęto na stronie 98: „Głównym celem pracy doktorskiej było zbadanie mechanizmu prokognitywnego działania preparatu peptydowego yolkina.”. W tymże celu głównym zawierają się cele szczegółowe, wymienione przez Doktorantkę i przyporządkowane poszczególnym etapom badań. Byłoby korzystne na takiej podstawie zwerbalizować wprost hipotezy badawcze, takie jak:

- preparat peptydowy yolkina uzyskany z jaj kurzych metodą opisaną przez Polanowskiego i wsp. ma odpowiednią czystość i stabilność oraz zawiera peptydy o sekwencji aminokwasowej homologicznej do fragmentów witellogeniny;
- preparat peptydowy yolkina działa przez wpływ na sekrecję BDNF;
- preparat peptydowy yolkina wpływa na aktywację szlaków sygnałowych prowadzących do aktywacji czynnika CREB;
- preparat peptydowy yolkina zmienia morfologię komórek PC<sub>12</sub> i H<sub>19-7</sub> użytych w hodowli;





- preparat peptydowy yolkina wykazuje aktywność przeciwutleniającą oraz wpływa na regulację systemu antyoksydacyjnego;

- preparat peptydowy yolkina wpływa na efekty działania agregatów A $\beta$ .

Wobec tak postawionych pytań przeprowadzone przez Doktorantkę analizy dostarczyły wyczerpujących odpowiedzi, którym odpowiadają poszczególne wnioski na str. 109 pracy.

Przed prezentacją wyników znajduje się opis Materiałów i metod użytych w eksperymentach. Wymienione są odczynniki i reagenty, gotowe zestawy laboratoryjne, przeciwciała, oligonukleotydy, aparatura, akcesoria i linie komórkowe. Doktorantka wylicza programy komputerowe, z których korzystano oraz opisuje prace laboratoryjne. Przy niektórych etapach analiz wymienia imiennie współpracowników, którzy czuwali nad fachowym przeprowadzeniem doświadczeń, co świadczy o rzetelności i otwartości na współpracę zaangażowanego zespołu.

Na stronach 63-95 zaprezentowano uzyskane wyniki. W zakresie opisanych cech preparatu peptydowego yolkina Doktorantka przedstawiła dokumentację fotograficzną, wykresy i tabele wyników metodą spektrometrii mas. Natomiast od strony 68 opis uzupełniają zdjęcia żeli lub obrazów mikroskopowych oraz ryciny ilustrujące wartości średnie, minima, maxima. Czy wartości skrajne tzw. „pudełka” na wykresach odpowiadają kwartyłom górnemu i dolnemu czy odchyleniom standardowym? W opisie rycin wymieniony jest statystyczny test t-Studenta. Uważam, że korzystnie byłoby zamieścić tabele z wartościami pomiarów i wynikami w formie liczbowej oraz opis metod uzupełnić o wybrane do tej pracy analizy statystyczne. Wartości liczbowe znalazły się w tabeli 7.3 przedstawiającej aktywność przeciwutleniającą yolkinę.

Dobrane metody laboratoryjne i obliczeniowe nie budzą zastrzeżeń, choć w niektórych analizach możliwe byłoby wzbogacenie np. o wyniki korelacji.

Przedstawione przez Doktorantkę wnioski znajdują poparcie w przedstawionych wynikach i odpowiadają założonemu celowi badania. Szczególnie interesujące są obserwacje, że stymulacja kompleksem peptydowym yolkina prowadzi do zwiększenia produkcji m-BDNF oraz że hamuje on agregację białka A $\beta$  i chroni neurony przed jego toksycznym wpływem.

Natomiast część rozprawy poświęcona na dyskusję wyników jest relatywnie krótka i pozostawiła pewien niedosyt u czytelnika będącego lekarzem. Doktorantka, oprócz starannej pracy laboratoryjnej, zwróciła uwagę na potencjalny aspekt praktycznego wykorzystania preparatu peptydowego yolkina oraz rolę nutraceutyków dla zdrowia społeczeństwa. Byłabym bardzo ciekawa, czy i w jakim stopniu wpływ yolkinę na ekspresję białek w komórce nerwowej odpowiada zmianom profilu mRNA lub białek obserwowanym w poszczególnych chorobach ośrodkowego układu nerwowego. Czy preparat ten ma potencjał, by zmiany

chorobowe na poziomie profilu transkryptomycznego odwrócić przykładowo w otępieniu typu alzheimerowskiego lub w schizofrenii?

Wspomnę także o nielicznych, drobnych redakcyjnych usterkach, które nie mają wpływu na wartość merytoryczną rozprawy doktorskiej (np. na stronie 17 jest „ang. catalyse” a powinno być „catalase”; używane jest sformułowanie o komórkach „ekspresjonujące” (np.str.25), co nie brzmi dobrze w języku polskim). Dla tabeli 7.2 nie podano objaśnień symboli w kolumnach. Na rys. 7.21 nie są widoczne słupki dla komórek niestymulowanych. Wykaz skrótów na początku rozprawy nie jest kompletny, uzupełnienie ułatwiłoby czytelnikowi niebędącemu biochemikiem prześledzenie myśli Autorki.

Uwagi te nie mają wpływu na moją wysoką ocenę pracy, którą czytałam z dużym zainteresowaniem i która posiada zarówno walory poznawcze, jak i potencjał dla praktycznego zastosowania. Na podkreślenie zasługuje systematyczna i dogłębna analiza właściwości preparatu yolkiny z wykorzystaniem m.in. spektrometrii mas. Doktorantka wyizolowała peptydy z komercyjnie dostępnego źródła jaj kurzych, co pozwala mieć nadzieję, że pozyskane substancje są reprezentatywne dla ogólnodostępnej żywności. Dokonano bardzo trafnego wyboru linii komórkowych do hodowli, biorąc pod uwagę różnice fenotypów tj. posiadania receptora TrkB dla BDNF na powierzchni komórek H<sub>19-7</sub> i jego nieobecność w błonie komórek PC<sub>12</sub>. Kolejne etapy badań molekularnych przeprowadzono w taki sposób, by konsekwentnie, systematycznie i klarownie eksplorować efekty stymulacji yolkiną w zakresie procesów biochemicznych odgrywających kluczową rolę w starzeniu się mózgu.

W świetle przedstawionej pozytywnej oceny stwierdzam, że złożona do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr inż. Wioletty Kazany-Płuszki spełnia warunki określone w art.13 ust.1 Ustawy z dnia 14 marca 2003 o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz.595, z późn. zm.). W związku z tym przedkładam Instytutowi Immunologii i Terapii Doswiadczałnej Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu wniosek o dopuszczenie Pani mgr inż. Wioletty Kazany-Płuszki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Dr hab. n. med. Joanna Pawlak  
lekarz specjalista psychiatra  
6564410  
Dr hab. n. med. Joanna Pawlak