

Kraków, 06.09.2024

## Ocena

### rozprawy doktorskiej mgr Darii Korewo-Labelle

#### pt. **“Wpływ suplementacji witaminą D3 na mitochondrialny metabolizm tlenowy i neuroprotekcję w szczurzym hipokampie podczas długotrwałej ekspozycji na działanie glikokortykosteroidów”.**

Witamina D3 jest lekiem wielokierunkowym o działaniu zarówno genomowym, jak i niegenomowym oraz dobrze udowodnionych właściwościach neuroprotekcyjnych, przeciwzapalnych i regeneracyjnych. Wykazano, że witamina D3 może regulować kluczowe mechanizmy molekularne śmierci neuronów i przeżycia, a oprócz korzystnego wpływu na tkankę neuronalną, ma także działanie ochronne na układ naczyniowy i integralność bariery krew-mózg. Ostatnie lata wskazują na jej potencjał do modulowania aktywności osi podwzgórze-przysadka-nadnercza (HPA), głównie dzięki pobudzającemu wpływowi na neuroprzebieżniki i syntezę czynnika neurotroficznego BDNF. Co więcej, sugeruje się także potencjalne zaangażowanie receptorów glikokortykoidowych (GR) w sygnalizację witaminy D3. Niekompletne jak dotychczas dane wskazują na potrzebę dokładniejszego poznania i omówienia skuteczności potencjalnego leczenia witaminą D3, biorąc pod uwagę oba receptory, a mianowicie receptory dla glikokortykoidów oraz dla witaminy D3. Dane dotyczące możliwej interakcji i funkcjonalnego współdziałania między nimi są jak dotąd niejednoznaczne. Lepsze zrozumienie mechanizmu molekularnego działania witaminy D3 powinno pomóc dokładniej ustalić skuteczne dawki i odpowiednią grupę pacjentów z deficytami jej poziomów, którzy mogliby skorzystać z leczenia witaminą D3. Biorąc pod uwagę powyższe dane, w pełni zasadny i aktualny wydaje się wybór tematu badawczego rozprawy doktorskiej mgr Darii Korewo-Labelle, który wpisuje się, w nowoczesne trendy poszukiwań interakcji i molekularnych mechanizmów, pomiędzy długotrwale podniesionymi poziomami glikokortykoidów, charakterystycznymi dla wielu jednostek chorobowych, a suplementacją witaminy D3.

Rozprawa doktorska mgr Darii Korewo-Labelle ma formę hybrydową i oparta została o dwa opublikowane wieloautorskie manuskrypty oraz nieopublikowane jeszcze wyniki badań dodatkowych Autorki. W skład rozprawy doktorskiej wchodzi *Streszczenia w języku polskim i angielskim, Wprowadzenie, Cel i Hipotezy* pracy oraz oryginalne wersje manuskryptów wraz z krótkim ich omówieniem. Na kolejnych stronach Autorka przedstawiła opis *Materiałów i Metod*

oraz zaprezentowała *Wyniki* badań, które nie znalazły się w opublikowanych pracach. Końcowe strony dysertacji obejmują *Dyskusję*, *Podsumowanie* i *Wnioski*, a także spis ilustracji oraz wykorzystanego w rozprawie piśmiennictwa. Całość tekstu liczy 168 stron.

Rozprawę rozpoczyna wykaz skrótów, który ułatwia poruszanie się po tekście pracy doktorskiej oraz wspomniane już streszczenia. Rozdział kolejny – *Wprowadzenie* liczy 29 stron i stanowi ciekawe opracowanie przydatne do analizy podjętej w pracy tematyki. Autorka omówiła rodzaje stresu (eustres, distres), etapy syntezy glikokortykoidów jako głównych mediatorów tej reakcji oraz wskazała na molekularne mechanizmy aktywacji receptorów dla glikokortykoidów tj. GR i MR. Opisała także wybrane modelowe bodźce stresowe (takie jak ekspozycja na zimno, czy podania dexametazonu), które wykorzystane zostały w dalszej części dysertacji. Na kolejnych stronach Autorka przedstawiła w sposób jasny i przejrzysty informacje dotyczące struktury hipokampa, jego udziału w zjawiska plastyczności oraz nakreśliła mechanizmy wewnątrzkomórkowego przekazu sygnału zaangażowane w procesy neuroprotekcji i neuroregeneracji (IGF-1, BDNF) w odpowiedzi na neurotoksyczność wywołaną długotrwałe podniesionymi poziomami glikokortykoidów. Kolejne strony *Wprowadzenia* to dalsze nawiązanie do tematu dysertacji, w tym opis procesów energetycznych zachodzących przy udziale mitochondriów, wybranych szlaków metabolizmu oraz bioenergetyki komórek nerwowych, a także związane dane dotyczące procesu stresu oksydacyjnego generowanego w wyniku procesów stresowych. Warto wspomnieć, że niektóre z informacji wzbogacono dodatkowo ilustracjami wykonanymi przez Autorkę. Istotne znaczenie dla omawianej dysertacji ma zawarte na ostatnich stronach tego rozdziału, skrótowe kompendium wiedzy dotyczące witaminy D3 oraz spojrzenie medyczne na rolę jej niedoborów w patologii jak i aktualne dane dotyczące suplementacji tym związkami. Bardzo istotne informacje zamieszczono w ostatnim akapicie, gdzie Autorka jasno definiuje przesłanki, które zadecydowały o podjęciu przez Nią badań zamieszczonych w rozprawie w tym wskazując na rolę witaminy D3 w procesach neuroplastyczności, neurogenezy w dorosłym mózgu, a także jej potencjalnym wpływie na neuroprotekcję poprzez pozytywną modulację poziomu neurotrofin. Ogólnie, rozdział ten napisany został poprawnie i wskazuje na dobrą znajomość merytoryczną Autorki w poruszonym w nim obszarze wiedzy. Tym niemniej z obowiązku recenzenta muszę wspomnieć, że nie tylko ten rozdział, ale cała dysertacja nie doczekała się wnikliwej korekty językowej. Szkoda, że Autorka nie wykonała jej przed złożeniem pracy do recenzji. Błędy stylistyczne znaleźć można praktycznie na każdej ze stron maszynopisu, a nawet na stronie tytułowej rozprawy (zamieszczono na niej informację: promotor prof. UG dr hab. Jana Jacka Kaczora, i w następnej linijce dr Mateusza Jakuba Karni”). Być może w jednej z poprzednich wersji rozprawy na stronie tytułowej widniało zwyczajowe sformułowanie: „praca wykonana pod opieką promotora i promotora pomocniczego” (i tu następują imiona i nazwiska w powyżej wspomnianej formie), którego niestety w przesłanej mi do oceny wersji próżno szukać. Nie będę w tym miejscu przytaczać kolejnych błędów językowych, stylistycznych, braków znaków interpunkcyjnych, czy „zlepków” wyrazów (czasowników, rzeczowników) ze spójnikami, które znalazłam w trakcie czytania rozprawy. Pozwolę sobie tylko zwrócić uwagę na pewne nieścisłości merytoryczne w tym fakt, iż cytokiną prozapalną jest TNF- $\alpha$ , a nie TNF-1 $\alpha$  (lista skrótów użytych w rozprawie), czy nieścisłość pomiędzy tekstem, a ryciną 1. Wiadomo, bowiem, że od receptorów GR przed translokacją do jądra odłączane są białka towarzyszące np. FKBP51 (czego nie pokazano na tej ilustracji). Co więcej, stwierdzenie „BDNF najczęściej obserwowany jest w hipokampie i korze czołowej (zamieszczone na stronie 27)”, jest nieco mało precyzyjne, być może warto je zastąpić poziomem czy ekspresją tego czynnika, gdyż określenie „obserwowany” nie należy do kanonu używanego w neuronauce. W omawianym rozdziale znalazły się też inne wymagające uzupełnienia braku, żeby wspomnieć opis interakcji czynnika IGF-1 z białkami

wiązającymi IGF-1 (IGFBP) w którym pominięto informację o interakcję z którym konkretnym białkiem wiążącym chodzi, a biorąc pod uwagę fakt, iż aktywność tworzonych kompleksów IGF-1/IGFBP jest ściśle uzależniona od rodzaju białek wiążących i wywiera odmienne efekty biologiczne w tym aktywację lub hamowanie receptora IGF-1 taka informacja powinna się znaleźć w dysertacji.

Na kolejnych stronach rozprawy w oparciu o przytoczone we *Wprowadzeniu* piśmiennictwo oraz posiadaną wiedzę Autorka postawiła interesującą hipotezę, że suplementacja witaminą D3 może mieć istotne znaczenie w ograniczaniu/łagodzeniu deficytów indukowanych przez długotrwałą ekspozycję na glikokortykosteroidy w hipokampie szczurów, postulując szczególnie wpływ tej suplementacji na dysfunkcje metabolizmu tlenowego, indukcję stresu oksydacyjnego oraz procesy wewnątrzkomórkowe i szlaki przekazu sygnału regulowane przez neurotrofiny w tej strukturze. Weryfikację tej hipotezy mgr Korewo-Labelle zaplanowała w oparciu o trzy cele szczegółowe. Zapoznając się z nimi, można mieć nieco wątpliwości czy realizując każdy z nich Autorka planowała ocenę suplementacji tym samym związkiem, gdyż zbyt daleko idącym „uproszczeniem” jest używanie zamiennie określenia witamina D, vs witamina D3, biorąc pod uwagę zróżnicowaną aktywność biologiczną poszczególnych form tego związku (jest ich aż 5) jak i zróżnicowaną aktywność jego poszczególnych metabolitów.

Kluczowe znaczenie merytoryczne dla ocenianej rozprawy mają wyniki uzyskane przez mgr Korewo-Labelle i zaprezentowane w dwóch pracach oryginalnych oraz uzupełnione niepublikowanymi jeszcze badaniami własnymi. W pracy „*The positive impact of vitamin D on glucocorticoid-dependent skeletal muscle atrophy*”, która opublikowana została w czasopiśmie *Nutrients* (2021), Doktorantka jest drugim autorem. Zgodnie z zamieszczonymi oświadczeniami Jej wkład w powstanie pracy polegał na pozyskaniu materiału do badań oraz wykonaniu prac laboratoryjnych, co budzić może pewne wątpliwości dotyczące wiodącego współautorstwa w powstanie tej publikacji. W pracy tej wykazano zróżnicowany wpływ suplementacji witaminą D3 na egzogennie i endogennie indukowaną aktywację osi HPA, którą oceniano głównie jako potencjał do hamowania atrofii mięśniowej u szczurów. Efektywność suplementacji witaminą D3 obserwowano jedynie w modelu przewlekłego podawania deksametazonu (DEXA) w formie iniekcji dootrzewnowych w przeciwieństwie do jej braku w modelu zanurzania zwierząt w zimnej wodzie. Zakres badań oraz przedstawione w tej pracy wyniki nie są zatem bezpośrednio związane z tytułem rozprawy. Być może pracę tą traktować należy jako wstęp i weryfikację modelu badawczego, w którym następnie Autorka kontynuowała badania, a uzyskane w tym samym modelu doświadczalnym (zanurzanie w zimnej wodzie) rozbudowane wyniki odnoszące się bezpośrednio do tematyki rozprawy, zamieściła na końcowych stronach dysertacji. Prosiłabym o komentarz w tej sprawie w trakcie publicznej obrony.

Natomiast w pracy opublikowanej w *International Journal of Molecular Sciences* (2023) mgr Daria Korewo-Labelle jest pierwszym autorem, a Jej udział w powstanie tej publikacji można uznać za wiodący, gdyż obejmował uczestnictwo w zaprojektowaniu badań, pozyskanie materiału do analizy, prace laboratoryjne, a także przeprowadzenie analizy statystycznej i interpretacji uzyskanych wyników oraz udział w pisaniu manuskryptu. Praca ta znalazła uznanie na etapie recenzji, dlatego podkreślę jedynie jej najważniejsze aspekty poznawcze które obejmują:

- wykazanie supresyjnego efektu wielokrotnych podań DEXA na masę hipokampa i ekspresję białka receptora GR, któremu towarzyszył obniżony poziom proBDNF oraz aktywnej ufosforylowanej formy kinazy AKT;

- wykazanie dysfunkcji biogenezy mitochondriów (obniżenie poziomu białka PGC-1 $\alpha$ ) oraz mitochondrialnego metabolizmu energetycznego (spadek aktywności syntazy cytrynianowej);

- pokazanie ochronnego potencjału suplementacji witaminą D3 na wywołane podaniami DEXA deficyty w tym obniżoną masę hipokampa, poziom mBDNF oraz poziom pAKT, a także częściowo na poziomie metabolizmu mitochondrialnego.

W ostatniej części dysertacji zamieszczono dodatkowe nieopublikowane jeszcze wyniki badań, które poprzedzono opisem przeprowadzonych doświadczeń (wraz z ich schematem) oraz materiałów i metod badawczych stosowanych przez Autorkę. Wszystkie metody doświadczalne dobrano prawidłowo, a ich opis wzbogacony przydatnymi tabelami daje możliwość ich wiernego powtórzenia. Po lekturze tego rozdziału nasunęło mi się jednak kilka pytań, a mianowicie: czy Autorka rzeczywiście uważa *Western Blot* za ilościową metodę identyfikacji białka; dlaczego w opisie metod statystycznych pojawia się zamiennie określenie ANOVA jednoczynnikowa oraz jednokierunkowa czy takie było zamierzenie Autorki; na stronie 94 znalazłam informację, że w „celu zapewnienia optymalnego wzbogacenia środowiska zastosowane zostały odpowiednie atraktanty i akcesoria dla gryzoni”, zatem czy takie środowisko mogło mieć zdaniem Autorki wpływ na uzyskane przez nią wyniki w tej części dysertacji, czy też zastosowane zostało rutynowo także w badaniach opublikowanych w cyklu prac; o jakiej porze dnia „stresowano” zwierzęta przez umieszczanie ich w zimnej wodzie oraz w jakim odstępie czasowym od ostatniej procedury i o jakiej porze dnia pobierano tkankę do badań? W kontekście dobowych zmian w poziomach endogennych glikokortykoidów oraz ekspresji receptorów GR ma to moim zdaniem kluczowe znaczenie.

Prezentowane przez Autorkę wyniki badań uzyskano z wykorzystaniem wielu nowoczesnych i pracochłonnych metod, co wskazuje na Jej duży wkład pracy oraz biegłość w opanowaniu zróżnicowanego warsztatu badawczego. Ogólnie, uzyskane wyniki wskazują na odmienny wpływ podwyższonego poziomu glikokortykoidów endogennych indukowanych stresem oziębienia w porównaniu z obserwacjami poczynionymi w modelu wielokrotnych podań DEXA. Inny jest także potencjał i zakres protekcyjnego działania witaminy D3. Dlatego mój niedosyt budzi objętość i treść zamieszczonej na końcowych stronach dysertacji *Dyskusji*. Ograniczenie jej do omówienia tylko wyników nieopublikowanych uzyskanych w modelu indukcji endogenego wzrostu glikokortykoidów jest słabym punktem rozprawy. *Dyskusja*, powinna być autorskim opracowaniem mgr Darii Korewo-Labelle prezentującym Jej zasób wiedzy, umiejętność wykazania spójności tematycznej wszystkich uzyskanych przez Nią wyników, formułowania wniosków i posługiwania się piśmiennictwem naukowym, dlatego zaskakuje mnie jej ograniczona do minimum formuła. Moim zdaniem umiejętność dyskusowania wyników nawet negatywnych, na tle innych własnych oraz dostępnego piśmiennictwa (pod warunkiem, że nie jest błędnie cytowane jak np. Trojan i wsp.) zawsze stanowi wartość dodaną, zwłaszcza dla Osoby na początkowym etapie rozwoju naukowego. Nie zgadzam się zatem z lakonicznym stwierdzeniem Autorki, że wyniki te dyskutowano już w opublikowanych manuskryptach, gdyż całościowy ich odbiór w kontekście wszystkich wyników stanowiących podstawę dysertacji mógłby, a wręcz powinien mieć szerszy zakres merytoryczny. Co więcej, po zapoznaniu się z *Dyskusją* chciałabym prosić o komentarz do pytań, które nasunęły mi się po lekturze tego krótkiego rozdziału.

1. Jak Autorka tłumaczy celowość suplementacji witaminą D3 przy braku zmian w jej poziomie w modelu endogennym? Jaki zdaniem Autorki jest potencjalny mechanizm działania endogennie indukowanych glikokortykoidów na masę hipokampa przy braku zmian receptorowych (brak zmian w poziomach GR i MR)?

2. Strona 108 w tekście znalazłam informację: „poziom ufosforylowanej formy kinazy Akt w grupie zwierząt stresowanych oraz suplementowanej witamina D3 był znacznie obniżony w porównaniu do kontroli” natomiast rycina 10c nie pokazuje zmian istotnych statystycznie.
3. Większość zmian w grupie eksponowanej na zimno oraz eksponowanej na zimno i suplementowanej witaminą D3, jeśli w ogóle występuje, ma podobny kierunek (np. wzrost poziomu RBM3, NFL, spadek proBDNF, brak zmian w PGC-1 $\alpha$ , COX IV, II czy aktywności syntazy cytrynianowej) które zatem wyniki dają Autorce jednoznaczne podstawy do wnioskowania o ochronnym działaniu witaminy D3 w tym modelu?

Na końcowych stronach dysertacji zamieszczono *Podsumowanie i Wnioski* opracowane osobno dla dwóch modeli doświadczalnych, po których następuje spis ilustracji i piśmiennictwa wykorzystanego w dysertacji przez Autorkę.

Podsumowując, przedstawiona do oceny rozprawa doktorska mgr Darii Korewo-Labelle ma formę hybrydową, a oparto ją o wyniki zaprezentowane w dwóch opublikowanych manuskryptach oraz o niepublikowane jeszcze wyniki badań własnych Autorki. Jej polskojęzyczny tekst nie został poddany wnikliwej korekcie językowej, co skutkuje wieloma błędami stylistycznymi oraz systemowymi w tym gramatycznymi czy leksykalnymi oraz nieścisłościami graficznymi, co utrudnia poruszanie się po tekście dysertacji. Tym niemniej opracowanie to stanowi oryginalne rozwiązanie problemu badawczego i wnosi nowe spojrzenie na dotychczas niebadane mechanizmy dotyczące wpływu suplementacji witaminą D3 na deficyty indukowane w warunkach długotrwałej aktywacji osi HPA, dlatego poczynione z obowiązku recenzenta komentarze i uwagi, w sposób kluczowy nie wpływają na całościową wartość merytoryczną tego opracowania.

Stwierdzam, że rozprawa doktorska pt. ” Wpływ suplementacji witaminą D3 na mitochondrialny metabolizm tlenowy i neuroprotekcję w szczurzym hipokampie podczas długotrwałej ekspozycji na działanie glikokortykosteroidów” spełnia warunki określone w art. 187 ust 1 i 2 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce i wnioskuję do Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie pani mgr Darii Korewo-Labelle do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Prof. dr hab. n. med. Agnieszka Basta-Kaim