



Białystok 12. 09. 2024

Opinia

O rozprawie 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”.

Promotorem jest dr hab. Jan Jacek Kaczor, profesor Uniwersytetu Gdańskiego

Promotorem pomocniczym jest dr Mateusz Jakub Karnia

Pracę wykonano w Katedrze Fizjologii Zwierząt i Człowieka, Wydział Biologii, Uniwersytet Gdański.

W skład rozprawy wchodzi: Wprowadzenie, dwa oryginalne opublikowane artykuły naukowe i moim zdaniem trzeci, niepublikowany jeszcze, artykuł w jęz. polskim. Artykuł ten jest w pełni przygotowany do druku, chociaż nie został jeszcze zatytułowany i nie podano jego autorów. Zważywszy na walory naukowe tego artykułu można sądzić, że zostanie niebawem zgłoszony w wersji angielskiej do druku w czasopiśmie międzynarodowym. Inne części rozprawy to: Podsumowanie, Wnioski, Piśmiennictwo i inne niezbędne informacje dodatkowe.

Rozdział Rozprawy zatytułowany „Wprowadzenie” liczy aż trzydzieści stron i ma charakter starannie napisanej monografii. Podzielono go na 10 podrozdziałów, które obejmują całość badanej w rozprawie problematyki. Szczególnie dużo uwagi, co jest zrozumiałe w świetle celu pracy, poświęcono hipokampowi. Z uznaniem przyznać należy, że zakres omawianej we „Wprowadzeniu” problematyki dowodzi rozległej wiedzy Doktorantki na ten temat. Omówiono m.in. zagadnienia stresu,

mechanizmy działania glikokortykosteroidów, funkcjonowanie hipokampa, stres oksydacyjny oraz biologię witaminy D. Należyta uwagę poświęcono roli witaminy D w funkcjonowaniu komórek nerwowych.

Część doświadczalną rozprawy oparto na dwóch publikacjach i jednym maszynopisie, a mianowicie:

1. Karnia M.J., Korewo D., Myślińska D., Ciepielewski Z.M., Puchalska M., Konieczna-Wolska K., Kowalski K., Kaczor J.J. The positive impact of Vitamin D on glucocorticoid-dependent skeletal muscle atrophy. *Nutrients* 2021, 13, 936 (IF 4,8. MEiN 140).
2. Korewo-Labelle D., Karnia M.J., Myślińska D., Kaczor J.J. Supplementation with Vitamin D₃ protects against mitochondrial dysfunction and loss of BDNF-mediated Act activity in the hippocampus during long-term dexamethasone treatment in rats. *Int J Mol Sci* 2023, 24, 13941 (IF 4,9, MEiN 140).
3. Maszynopis wspomnianej wyżej pracy zawiera wyniki uzyskane w badaniu wpływu stresu zimna i suplementacji witaminą D na wybrane parametry biochemii hipokampa..

Punktacja czasopism, zarówno IF jak też MEiN, w których prace opublikowano oraz lektura tych prac jednoznacznie wskazują na ich wysoki poziom naukowy. Dostrzec można pewną niespójność pomiędzy tytułem rozprawy a tytułem pierwszej publikacji. Jednakże bliższa analiza tych prac wskazuje, że jest to niespójność pozorna. Doktorantka jest drugim autorem pierwszej publikacji a więc wniosła niezaprzeczalny wkład w jej przygotowanie. Wkład ten polegał na wiodącym udziale w wykonaniu części doświadczalnej pracy, w tym we wdrożeniu metod laboratoryjnych zastosowanych w pracy drugiej (i trzeciej). Upoważnia Ją to, w moim przekonaniu, do włączenia części wyników publikacji pierwszej do rozprawy doktorskiej.

Doktorantka sformułowała trzy cele badawcze. Cele te wypływają logicznie z treści „Wprowadzenia”. Postanowiła, mianowicie, zbadać wpływ suplementacji witaminą D na wybrane efekty działania długotrwałej ekspozycji na działanie glikokortykosteroidów w hipokampie szczura na:

1. Zawartość receptorów gliko- i mineralokortykosteroidowych a także receptorów witaminy D

2. Zawartość białek związanych z neuroprotekcją (IGF-1, Akt oraz ufosforylowana forma tego enzymu, proBDNF i mBDNF).
3. Zawartość RBM3 (białka wiążące RNA3) oraz NFL (łańcuchy lekkich neurofilamentów)
4. Zawartość/aktywność wybranych białek mitochondrialnych, a mianowicie: zawartość podjednostek II i IV COX, aktywności oksydazy cytochromu c, aktywność syntazy cytrynianowej oraz PGC-1 α)
5. Zawartość markerów uszkodzeń wolnorodnikowych (8-izoprostanów, dialdehydu malonowego oraz zawartości grup sulfhydrylowych (-SH).

Zastosowano więc kompleksową, bogatą metodykę badań. Tak szerokie podejście do badanego problemu pozwala na jego wielostronną ocenę.

Doświadczenia wykonano na szczurach rasy Wistar. Stężenie glikokortykosteroidów we krwi zwiększano na dwóch drogach, a mianowicie przez:

- a) codzienne podawanie deksametazonu w czasie 28 dni
- b) codzienną, trwającą 28 dni, 60min dziennie, ekspozycję na obniżoną temperaturę (0-4^o) wody, w której umieszczano szczury.

Stwierdzono, że obie procedury prowadziły do wzrostu poziomu kortykosteronu we krwi. Dynamika tych zmian jest prawdopodobnie różna w obu grupach.

W podgrupach eksperymentalnych szczurom podawano witaminę D zaś w podgrupach kontrolnych podawano olej. Zwraca uwagę dokładny opis warunków „bytowych” szczurów, jak wymiary klatki, liczba zwierząt w klatce, pokarm etc. Warunki te spełniają przepisy Unii Europejskiej oraz przepisy Krajowe.

Uzyskano szereg niezwykle interesujących i ważnych wyników. Opisano je klarownie i przedstawiono na czytelnych rycinach. Wyników jest bardzo dużo a więc przytoczę jedynie te najważniejsze. I tak, stwierdzono że zarówno deksametazon jak też przedłużony stres w postaci ekspozycji na zimno

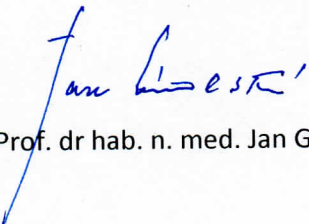
zmniejsza masę hipokampa. Jest to niezwykle ciekawa obserwacja. Szczury poddawano działaniu stresu zimna przez 60min dziennie a więc przez stosunkowo krótki okres czasu. Mimo to efekt jego działania przejawiał się powyższą zmianą morfologiczną. Suplementacja witaminą D częściowo zmniejszyła redukcję masy hipopotama przez deksametazon lecz nie wpłynęła na jej wielkość powodowaną przez stres zimna. Poziom białka receptora wit D oraz receptora mineralokortykoidowego (MR) nie uległ zmianie pod wpływem deksametazonu, natomiast poziom receptora glikokortykosteroidowego (RG) uległ znacznemu obniżeniu. Witamina D zapobiegła temu spadkowi. Ekspozycja na zimno nie wpłynęła na ekspresję badanych receptorów zarówno w obecności suplementacji witaminą D jak też bez tej suplementacji. Deksametazon nie wpłynął na poziom białka Akt natomiast obniżył kilkakrotnie poziom jego ufosforylowanej postaci. Redukcji te zapobiegała suplementacja witaminą D. Witamina D spowodowała niewielki spadek poziomu białka Akt po ekspozycji na zimno. Ani deksametazon ani też ekspozycja na zimno nie wpłynęły na poziom białka IGF-1. Deksametazon obniżył poziom proBDNF i nie wpłynął na poziom mBDNF w hipokampie.. Ekspozycja na zimno zmniejszyła poziom proBDNF i zwiększyła poziom mBDNF. Ten drugi był hamowany przez wit.D. Deksametazon nie wpłynął ani na poziom białka COX II ani też COX IV. Jednakże wit. D spowodowała znaczny wzrost poziomu białka COX II w grupie otrzymującej ten hormon. Deksametazon istotnie zmniejszył poziom białka PGC-1 α . Proces ten był częściowo hamowany przez wit. D. Ekspozycja na zimno zmniejszyła poziom białka COX IV i nie wpłynęła na poziom białka COX II. Nie wpłynęła także na poziom białka PGC-1 α . Deksametazon jak też stres zimna obniżyły aktywność syntazy cytrynianowej ale jedynie działanie hormonu ulegało hamowaniu przez wit. D. Niewielkie zmiany aktywności oksydazy cytochromu c pod wpływem deksametazonu czy też hormon + wit. D nie były istotne statystycznie. W pracy 3 (tej w maszynopisie) badano także poziom markerów uszkodzeń wolnorodnikowych w hipokampie. Stwierdzono, że ekspozycja na zimno zwiększyła nieistotnie stężenie 8-izoprostanów, istotnie stężenie aldehydu malonowego i obniżyła stężenie grup-SH w badanej strukturze mózgowia. Wit. D łagodziła te zmiany.

W każdej z prac cyklu zamieszczono długą dyskusję. Pozwoliło to na dokładne omówienie uzyskanych wyników jak też skonfrontowanie ich z istniejącym piśmiennictwem. Różnice w zachowaniu się niektórych parametrów pomiędzy grupą otrzymującą deksametazon a grupą eksponowaną na zimno należy przypisać różnicy w sposobie generowania i zapewne czasu trwania podwyższonego poziomu glikokortykosteroidów we krwi. Opisane różnice w efektywności działania wit. D na zachowanie się niektórych badanych parametrów pomiędzy badanymi grupami trudno jest obecnie wiarygodnie wyjaśnić. Trudno ocenić czy podobny wpływ zimna i witaminy D ma miejsce również w hipokampie człowieka. Wszakże także bywamy codziennie eksponowani na stres zimna. Oczywiście byłaby to jedynie próba spekulacji na ten temat.

Wit. D była, przez długie lata, łączona jedynie z regulacją metabolizmu wapnia w ustroju. Wyniki nowych badań dowodzą, że rola wit. D w ustroju jest znacznie szersza. Znaczący wkład w poszerzenie tej wiedzy wnoszą prace wchodzące w skład rozprawy doktorskiej mgr Darii Korewo-Labelle.

Wniosek końcowy.

Rozprawa doktorska mgr Darii Korewo-Labelle prezentuje bardzo wysoki poziom naukowy i spełnia wszystkie wymogi Ustawy. **Jednoznacznie popieram** wniosek o nadanie jej stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych, w dyscyplinie nauki biologiczne. Mam zaszczyt przedstawić Radzie Dyscypliny Nauki biologiczne Uniwersytetu Gdańskiego wniosek o dalsze procedowanie sprawy o nadanie Jej tego stopnia.



Prof. dr hab. n. med. Jan Górski