



Prof. dr hab. Michał Żmijewski,
Prorektor ds. Nauki
Kierownik Katedry Histologii,
Gdański Uniwersytet Medyczny,
ul. Dębinki 1a, Pokój 32
80-210 Gdańsk, Pomorskie
Polska
Tel: +48 583491455
Email: mzmijewski@gumed.edu.pl

Gdańsk, 27.09.2024

Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr Darii Korewo-Labelle

Tematem przedstawionej do recenzji rozprawy doktorskiej **mgr Darii Korewo-Labelle** jest: „Wpływ suplementacji witaminą D3 na mitochondrialny metabolizm tlenowy i neuroprotekcję w szczurzym hipokampie podczas długotrwałej ekspozycji na działanie glikokortykosteroidów”.

Promotorem pracy jest **Pan dr hab. Jan Jacek Kaczor, Prof. UG**, Katedra Fizjologii Zwierząt i Człowieka, Wydział Biologii, Uniwersytet Gdański (UG).

Promotorem pomocniczym jest **Pan dr Mateusz Jakub Karni**, Katedra Fizjologii Zwierząt i Człowieka, Wydział Biologii, UG.

1) Ocena merytoryczna

a) trafność podjętej tematyki i jej oryginalność.

Organizmy nie zawsze, żyją w optymalnych warunkach, dlatego też kluczowym mechanizmem obronnym jest centralna odpowiedź na zagrożenie. U organizmów wielokomórkowych, w toku ewolucji wytworzone zostały elementy centralnej odpowiedzi na stres, której podstawą są hormony wytwarzane przez oś podwzgórzowo-przysadkowo-nadnerczową (PPN). Co istotne, działanie tej osi, a więc całej odpowiedzi stresowej jest ściśle regulowane przez istnienie tak zwanego sprzężenia zwrotnego. W tym wypadku produkcja czynnika uwalniającego kortykotropinę (CRH) przez podwzgórze, oraz adrenokortykotropiny (ACTH) przez przysadkę jest hamowane przez wywarzany przez korę nadnerczy kortyzol. Niestety długotrwały stres powoduje stale utrzymujące się wysoką produkcję kortyzolu, co powoduje szereg negatywnych efektów związanych z deregulacją aktywności osi PPN. Prowadzi to nie tylko do zachowani depresyjnych, ale również deregulacji odpowiedzi immunologicznej oraz zaburzeń metabolicznych i bioenergetycznych w organizmie. Dla podjętej tematyki istotne są również wyniki ostatnich badań wskazujących, na modulacyjny wpływ witaminy D na działanie mitochondriów.

Głównym celem badawczym rozprawy doktorskiej **mgr Darii Korewo-Labelle** było zbadanie wpływu 28 dniowej suplementacji witaminy D3 w dawce 600 IU/kg/ dzień na aktywność mitochondriów w szczurzym hipokampie poddanych długotrwałej ekspozycji na działanie glikokortykosteroidów. Uważam, że podjęci tej tematyki jest szczególnie istotna obecnie, gdyż stres obecny jest w różnych płaszczyznach, a depresja i otyłość oraz choroby metaboliczne istotnym problemem medycznym.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska przygotowana została jako monografia, której podstawą są 2 artykuły naukowe. Taka forma jest zgodna z Art. 179 ust. 6-9 Ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018 r., poz. 1669 z późn. zm.). Praca zawiera, **aż 168 stron, w tym, przedruki dwóch publikacji pełnotekstowych**, które są podstawą przedstawionej do oceny

rozprawy. Należy jednak dodać, że rozprawa doktorska **mgr Korewo-Labelle**, w części opisowej, opiera się głównie o jeszcze nieopublikowane wyniki dotyczące wpływu witaminy D na hipokamp szczurów poddanych długotrwałemu stresowi (w zimnej lub ciepłej wodzie). Manuskrypt ma klasyczny układ rozprawy doktorskiej, zawiera również oświadczenia współautorów ww. prac, dotyczące ich udziału w prezentowanych badaniach oraz określających zaangażowanie doktorantki w powstanie tych prac. Manuskrypty składające się na rozprawę doktorską **mgr Korewo-Labelle** to:

Praca 1.

Karnia, M.J.; **Korewo, D.**; Myślińska, D.; Cielewski, 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).

Praca 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 Akt Activity in the Hippocampus during Long-Term Dexamethasone Treatment in Rats. *Int. J. Mol. Sci.* 2023, 24, 13941. (IF = 4,9; MEiN = 140)

W pierwszej pracy **mgr Korewo-Labelle jest drugim autorem**, a w drugiej pierwszym (**Praca 2**). Z przedstawionych oświadczeń wynika, że była głównym wykonawcą części doświadczalnej w **pracy 2**, natomiast w **Pracy 1**, jej rola ograniczyła się do pozyskania materiału do badań i wykonaniu części prac laboratoryjnych, niestety mimo przedstawienia oświadczeń przez wszystkich współautorów trudno jest wyodrębnić które z badań wykonała doktorantka. Nie ma jednak wątpliwości, że odegrała zasadniczą rolę w powstaniu obu prac (szczególnie drugiej), a sam manuskrypt rozprawy doktorskiej zawiera również jeszcze nieopublikowane wyniki, co wskazuje na **znaczący udział mgr Korewo-Labelle w wykonaniu części doświadczalnej oraz przygotowaniu publikacji (szczególnie Pracy 2) będących podstawą przedstawionej do oceny rozprawy doktorskiej był znaczący.**

b) opis uzyskanych wyników

Do rozprawy doktorskiej Pani **mgr Korewo-Labelle** włączyła dwie publikacje, które powstały w Katedrze Fizjologii Zwierząt i Człowieka, Wydziału Biologii (UG), w zespole Profesora **Jana Jacka Kaczora (promotora)**, w ramach grantu **dr Mateusza Jakuba Karni (promotora pomocniczego)**. Pierwsza praca (Praca 1), opiera się nad w dwóch mysich modelach doświadczalnych, w których zbadano: wpływ przewlekłego podawania syntetycznego glikokortykosteroidu - deksametazonu (DEXA); oraz aktywację osi PPN poprzez systematyczne zanurzenie zwierząt w zimnej wodzie. Wśród najważniejszych wyników warto wyróżnić: obniżenie poziomu 25(OH)D3; obniżenie masy mięśniowej na przykładzie mięśnia płaszczkowatego i prostownika palców długich; spadek masy grasicy i śledziony pod wpływem długotrwałej ekspozycji na DEXA. Natomiast, podawanie witaminy D, podwyższało poziom 25(OH)D3, oraz częściowo znosiło negatywne efekty DEXA (protekcynny efekt obserwowano dla mięśnia płaszczkowatego oraz dla grasicy). Natomiast w doświadczeniach, w których stosowano zimną wodę jako stresor, pomimo znacznego wzrostu stężenia kortykosteronu w osoczu w stosunku do grupy kontrolnej (zanurzanej w ciepłej wodzie pozornym stresor). Autorzy sugerują, że przyczyną tej rozbieżności w wynikach może wynikać z efektów kompensacyjnych związanych ze nasileniem litogenezy i/lub syntezy białek mięśniowych w wyniku termogenezy drżeniowej. **Ciekawe jestem, czy zaobserwowano w którejs z grup również zwiększoną ilość przyjmowanych kalorii, co tłumaczyłoby brak spady masy mięśniowej przy zwiększonym wydatku energetycznym, związanym z niską temperaturą wody.**

W **pracy 2**, ponownie wykorzystano model szczurzy, w którym zwierzęta były poddane długotrwałej ekspozycji na DEXA. Tym razem jednak mgr Korewo-Labelle zbadała wpływ witaminy D3 na aktywność szlaku sygnałowego BDNF-Akt i mitochondrialny metabolizm energetyczny w hipokampie badanych zwierząt. Warto odnotować, że podawanie DEXA powodowało zarówno spadek masy hipokampów, jak również obniżeniem poziomu receptora glikokortykosteroidowego (GR) oraz białek

proBNF i pAkt, co mogło mieć wpływ na obserwowane efekty działania DEXA. Co więcej obniżenie poziomu PGC-1 α oraz aktywności syntazy cytrynianowej (CS) świadczą o dysfunkcji w biogenezie i bioenergetyce mitochondriów. Co istotne, zastosowanie suplementacji witaminą D3, ograniczało działanie DEXA na badane szlaki sygnalizacyjne oraz przynajmniej częściowo wywoływało ochronny efekt na mitochondria, a co najważniejsze na masę hipokampa.

W głównej części pracy, która opierała się na jeszcze niepublikowanych wynikach, **mgr Korewo-Labelle**, przedstawiła dalszą analizę molekularną wpływu witaminy D3 na hipokamp szczurów podanych stresowi termicznemu (zanurzenie w zimnej wodzie). Wśród najważniejszych wyników należy odnotować: w odróżnieniu od stosowania DEXA, endogenne glikokortykosteroidy, których produkcja była stymulowana przez powtarzalną ekspozycję na zimną wodę, nie wpływają na stężenie metabolitów witaminy D3. Natomiast suplementacja witaminą D3, nie zmieniała istotnie ekspresji receptora dla witaminy D3, czy też innych receptorów związanych z odpowiedzią na stres w hipokampie; oraz nie wpływała poziomu białek ochronnych. Z drugiej strony obserwowane były pozytywne efekty suplementacji witaminą D3, na mitochondrialną bioenergetykę oraz jej działanie antyoksydacyjne. Wydaje się, że godne odnotowania jest wykazanie częściowego obniżenia poziomu markerów wolnorodnikowego uszkodzenia białek i lipidów w tkance nerwowej.

Podsumowując, przedstawione wyniki zebrane przez mgr Korewo-Labelle sugerują, że suplementacja witaminą D3 odgrywa istotną rolę w zapobieganiu negatywnych efektów długotrwałego działania glikokortykosteroidów na organizm, ze szczególnym uwzględnieniem wpływu na hipokamp i tkankę mięśniową. Co ciekawe, zastosowanie naturalnego stresora (zimnej wody), pomimo obserwowanego zwiększenia poziomu kortykosteronu u zwierząt doświadczalnych, nie wywoływało znacznych zmian w badanych parametrach, a efekt suplementacji witaminą D3 ograniczał się do wybranych parametrów związanych z mitochondriami. **Ciekawy jestem czy zastosowanie innych warunków stresogennych niż zimna woda, nie wywołałoby oczekiwanych efektów.**

c) poprawność formalno-językowa, stylistyczna i interpunkcyjna, sposób prezentacji.

Rozprawa napisana jest poprawnie pod względem językowym, z niewielkimi tylko błędami powstałymi na etapie edycji, które w żadnej mierze nie utrudniają czytania pracy. Autorka swobodnie i poprawnie stosuje nomenklaturę fachową oraz zasady gramatyczne. Mam tylko drobną uwagę: Cornu Ammonis to Róg Amona, więc może warto konsekwentnie stosować nomenklaturę anatomiczną w języku polskim (strona 26).

2) Ocena metodologiczna

a) dobór literatury

Sama treść rozprawy doktorskiej **mgr Korewo-Labelle** zawiera szereg dobrze dobranych odnośników literaturowych, chociaż prace opublikowane po 2020 roku są mniej liczne; z drugiej strony ilość cytacji wydaje się odpowiednia. W tym, miejscu drobna uwaga dotyczące samej listy, praca *Pludowski et al. 2023* pojawia się 2 razy. Zauważyłem również drobną niekonsekwencję w alfabetycznym układzie listy (Pludowski, Płomiński i potem Pludowski). Są to oczywiście drobne pomyłki.

b) poprawność formułowania problemów i hipotez (założeń badawczych).

Rozprawa doktorska **mgr Korewo-Labelle**, wymienia 3 główne i dość rozbudowane cele badawcze, związane z potencjalną rolą witaminy D3 w ochronie hipokampa szczura w trakcie długotrwałej ekspozycji na działanie glikokortykosteroidów. Bezpośrednio do 3 celów odnoszą się 3 dobrze

sformułowane hipotezy badawcze. Wśród celów i hipotez brakuje tylko odniesienia do wyników przedstawionych w **Prace 1**, w której badano wpływ na mięśnie i organy układu odpornościowego. Wydaje się, jednak, że praca ta nie jest najistotniejszą częścią przedstawionych badań, a doktorantka nie była pierwszą autorką w tej publikacji.

c) trafność doboru metod i narzędzi badawczych, umiejętność ich zastosowania.


W przedstawionych badaniach **mgr Daria Korewo-Labelle** wykorzystwała dwa modele długotrwałego stresu u szczura. W pierwszym badała protekcyjny efekt witaminy D3, na modelu szczura poddanego długotrwałej ekspozycji na DEXA, a w drugim zastosowała stresor (zimną wodę) w celu indukcji produkcji naturalnych glikokortykosteroidów. W badaniach wykorzystano wiele klasycznych technik laboratoryjnych, jak qPCR czy western blot. Zbadano aktywność enzymatyczną, oznaczano poziomy markerów uszkodzeń wolnorodnikowych. Na szczególną uwagę zasługuje analiza metabolitów witaminy D3 czy też pobranie różnorodnego materiału badawczego u szczura (wybranych mięśni, hipokampa czy śledziony i grasicy), co wymagało sporej wprawy. Trudno jest jednak na podstawie oświadczeń doktorantki oraz współautorów publikacji ocenić, które zadania wykonała osobiście **mgr Daria Korewo-Labelle**.

d) poprawność układu pracy i struktury podziału treści.

Praca jest bardzo długa bowiem liczy 168 stron, jednak oprócz dość rozbudowanego wprowadzenia, który zawiera 29 stron oraz 40-stronicowej bibliografii; pozostałe elementy są odpowiedniej długości. Na uwagę, zasługuje szczegółowy opis części doświadczalnej. Do rozprawy włączono również przedruki dwóch publikacji oraz oświadczenia współautorów. Układ pracy jest odpowiedni, gdyż rozprawa zawiera: spis treści; objaśnienia skrótów, streszczenie w języku polskim i angielskim, wprowadzenie, cele oraz hipotezy badawcze, przedruki prac będących podstawą rozprawy doktorskiej oraz oświadczenia współautorów. Rozprawa zawiera również wydzielone rozdziały poświęcone: metodyce, wynikom oraz dyskusji. Kolejny rozdział zawiera podsumowania i wnioski; spisy ilustracji i tabel; oraz bardzo obszerną bibliografię. Szkoda tylko, że wyników nie omówiono i przedyskutowano razem, a dołączone publikacje oraz ich skrótowe omówienie, znajduje się przed główną częścią pracy. Sądzę, że łatwiej byłoby napisać pracę (a potem ją czytać), jakby wszystkie wyniki omówiono łącznie, a opublikowane prace zostałyby umieszczone jako dodatek. Należy jednak dodać, że obecny układ nie przeszkadza w czytaniu i zrozumieniu przedstawionych wyników.

3) wnioski końcowe.

Podsumowując, rozprawa doktorska mgr Darii Korewo-Labelle oparta jest na szerokim materiale jeszcze nieopublikowanym przedstawiony w formie manuskryptu, oraz dwóch publikacjach doświadczalnych, które ukazały się w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym. Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska spełnia wszystkie wymagania stawiane rozprawom doktorskim zgodnie z Art. 187 ust. 1 i 2 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce, dlatego też pozwalam sobie przedstawić Wysokiej Radzie Dyscypliny Nauki biologiczne Uniwersytetu Gdańskiego, wniosek o dopuszczenie Pani mgr Darii Korewo-Labelle do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora.

Katedra i Zakład Histologii
Gdański Uniwersytet Medyczny

Prof. dr hab. Michał Żmijewski

Gdańsk, dnia 27.09.2024

Prof. dr hab. Michał Żmijewski