



UNIwersytet Medyczny
IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH WE WROCLAWIU

Wrocław, 12.07.2019

Prof. dr hab. Krystyna Michalak
Katedra i Zakład Biofizyki
Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich
we Wrocławiu

**Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr Joanny Gerszon
pt. „Neuroprotecyjne właściwości piceatannolu w modelowych układach
biologicznych”**

Choroby neurodegeneracyjne powodujące uszkodzenie tkanki nerwowej, przede wszystkim takie jak choroba Alzheimera i choroba Parkinsona, stanowią jak wiadomo bardzo poważny problem kliniczny. W zaawansowanych stanach tych chorób dochodzi do ciężkich zaburzeń funkcjonowania układu nerwowego, w tym funkcji poznawczych, a także zaburzeń ruchowych i innych patologii prowadzących ostatecznie do śmierci pacjenta. Jak dotąd nie opracowano skutecznych sposobów terapii tych groźnych chorób. Patogeneza chorób neurodegeneracyjnych jest powiązana z indukowaniem śmierci komórek nerwowych w warunkach występowania stresu oksydacyjnego.

Tematyka rozprawy doktorskiej dotyczy potencjalnej możliwości wykorzystania naturalnych związków pochodzenia roślinnego z grupy stilbenów do zahamowania procesów przebiegających w stanach patologii w komórkach układu nerwowego prowadzących do ich degeneracji. W ramach swojej pracy Doktorantka skupiła się głównie na zbadaniu wpływu piceatannolu (pochodnej resveratrolu) na dwa typy komórek neuronalnych, ze szczególnym uwzględnieniem określenia roli oddziaływania tego związku z dehydrogenazą aldehydu 3-fosfoglicerynowego (GAPDH) w procesach molekularnych prowadzących do degeneracji tych komórek.

Praca doktorska Pani Joanny Gerszon wykonana została w Katedrze Biofizyki Molekularnej Instytutu Biofizyki na Wydziale Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego pod kierunkiem Pani dr hab. Aleksandry Rodackiej.

Podstawę pracy doktorskiej stanowi cykl 6 prac opublikowanych w czasopiśmie z listy Filadelfijskiej o łącznej wartości *Impact Factor* 20,79 (liczba punktów MNiSW=215). W przedstawionym cyklu publikacji 3 pozycje stanowią prace oryginalne, a kolejne 3 to prace przeglądowe. We wszystkich pracach oryginalnych doktorantka jest pierwszym autorem, a wśród trzech prac przeglądowych – w dwóch. Oprócz wykazu i kopii publikacji do pracy dołączone zostały oświadczenia współautorów o charakterze ich udziału w badaniach i redakcji publikacji oraz o procentowo określonym wkładzie w powstanie danej pracy.

Do pracy doktorskiej dołączone też zostało dobrze przygotowane streszczenie (w języku polskim i angielskim), w którym doktorantka jasno określiła cel przeprowadzonych badań oraz uzasadniła wybór do badań piceatannolu (pochodnej stilbenu), jako związku pochodzenia roślinnego o potencjalnych zdolnościach neuroprotektoryjnych. W streszczeniu zawarte jest zwięzłe podsumowanie osiągniętych wyników a we wniosku końcowym podkreślono potrzebę kontynuowania badań nad molekularnymi aspektami działania piceatannolu w komórkach neuronalnych.

Jednym z najważniejszych celów prowadzonych badań była ocena możliwości zastosowania piceatannolu (i ewentualnie innych związków pochodzenia roślinnego z grupy stilbenów) do ochrony komórek nerwowych przed szkodliwym działaniem stresu oksydacyjnego, prowadzącego m.in. do uszkodzenia enzymu - dehydrogenazy aldehydu 3-fosfoglicerynowego (GAPDH). Wyniki najnowszych badań prowadzonych w wielu laboratoriach na świecie wskazują, że dehydrogenaza GAPDH jest nie tylko enzymem glikolitycznym lecz białkiem wielofunkcyjnym, zaangażowanym w podstawowe szlaki komórkowe, m.in. w regulację genów, transport wewnątrzkomórkowy, sygnalizację poprzez receptory oraz utrzymanie integralności DNA.

Badania farmakologiczne pokazały, że GAPDH odgrywa fundamentalną rolę w różnych patologich, w tym również w chorobach neurodegeneracyjnych. Zdenaturowane formy tego enzymu oddziałują z białkami amyloidnymi a następstwem tych procesów jest śmierć komórek neuronalnych.

Dehydrogenaza GAPDH jest enzymem bardzo wrażliwym na oksydacyjne modyfikacje. Na jej aktywność wpływają przede wszystkim modyfikacje reszt cysteinowych w centrum aktywnym enzymu. Pod wpływem czynników stresogennych, jak stres oksydacyjny, w komórce następuje redystrybucja tego enzymu i akumulacja jego podjednostek w jądrze komórkowym oraz

ich wiązanie do DNA. Już wcześniej opisywano wpływ nadtlenu wodoru i innych oksydantów na aktywność enzymatyczną tej dehydrogenazy.

W zamieszczonym cyklu publikacji stanowiących pracę doktorską, prace eksperymentalne i przeglądowe umieszczone zostały w kolejności od najnowszej do najstarszej. W mojej opinii nie jest to optymalne rozwiązanie, gdyż kolejność chronologiczna (czyli od najstarszej do najnowszej) pozwoliłaby czytelnikowi lepiej śledzić rozwój prowadzonych przez doktorantkę badań. Wiadomo, że kolejno uzyskiwane wyniki dają podstawę do projektowania następnych doświadczeń i inspirują do dalszego zgłębiania zagadnienia. Na przykład wyniki badań nad osłabieniem przez piceatannol toksycznego wpływu nadtlenu wodoru na komórki nerwiaka płodowego N2a (*neuroblastoma*) przedstawione w pracy opublikowanej w *Journal of Functional Foods*, 2017r, a także nad wiązaniem piceatannolu z dehydrogenazą GAPDH w układzie modelowym (publikacja w czasopiśmie *PLOS one*, 2018r) zainicjowały dalsze badania nad wpływem tego związku na właściwości badanej dehydrogenazy, a te zaowocowały kolejną publikacją, ostatnią z cyklu prac eksperymentalnych, opublikowaną ponownie w czasopiśmie *J. Functional Foods* (2019). W tej ostatniej pracy zaproponowany już został mechanizm ochronnego wpływu piceatannolu na badane komórki hipokampa. Odwrotna kolejność zamieszczenia publikacji utrudnia śledzenie rozwoju badań prowadzonych w ramach pracy doktorskiej. Z tego względu w swojej recenzji przedstawiam swoją ocenę przeprowadzonych badań zgodnie z chronologią powstawania prac.

W pracy opublikowanej w 2017r w czasopiśmie *Journal of Functional Foods* (Gerszon i wsp., IF=3,767) doktorantka przedstawiła ciekawe wyniki swoich badań nad ochronnym działaniem piceatannolu przed uszkodzeniem komórek neuronalnych wywołanym obecnością w środowisku nadtlenu wodoru. Badania przeprowadzone na komórkach linii nowotworowej N2a (nerwiak płodowy – *neuroblastoma*) pozwoliły na określenie wpływu piceatannolu na przeżywalność tych komórek i na aktywność enzymów związanych ze stresem oksydacyjnym. Zwraca uwagę wielość przeprowadzonych oznaczeń aktywności enzymatycznej, m.in.: glutationowej reduktazy, glutationowej peroksydazy, glutationowej S-transferazy, dysmutazy ponadtlenu oraz katalazy. Oznaczano również stężenie wewnątrzkomórkowego zredukowanego glutationu GSH. Zbadano wpływ piceatannolu na proces apoptozy przy zastosowaniu testu z aneksyną V oraz obserwowano zmiany potencjału błony mitochondrialnej poprzez obserwację zmian we fluorescencji znacznika JC-1.

Sam piceatannol w stężeniu 5 μ M nie wpływał na przeżywalność badanych komórek, jednak w obecności nadtlenu wodoru zwiększał tę przeżywalność w stosunku do komórek poddanych działaniu samego nadtlenu. Pre-inkubacja komórek nowotworowych z piceatannołem,

a następnie zastosowanie H_2O_2 powodowało obniżoną apoptozę w stosunku do tego procesu indukowanego przez sam nadtlenek wodoru. Ponadto Doktorantka zaobserwowała ochronną rolę piceatannolu poprzez stabilizację na stałym poziomie mRNA sirtuiny 1 (SIRT1). Protekcyjny efekt tego związku na neurony związany był również ze wzrostem ekspresji glutationowej peroksydazy. Badania wykazały zatem, że piceatannol podwyższa przeżywalność badanych komórek nerwowych czyli działa neuroprotekcyjne.

Jak wspomniano powyżej, w warunkach stresu oksydacyjnego badania prowadzone przez doktorantkę i wsp. wykazały stymulację ekspresji białek o właściwościach neuroprotekcyjnych, np. sirtuiny 1. W tym miejscu należy zwrócić uwagę, że omawiane badania były prowadzone na komórkach linii nowotworowej nerwiaka płodowego (*neuroblastoma*) czyli na modelu komórkowym szeroko stosowanym m.in. w badaniach neurotoksyczności związków. Zwiększenie pod wpływem piceatannolu przeżywalności komórek neuronalnych w warunkach stresu oksydacyjnego jest obiecujące z punktu widzenia zwalczania chorób neurodegeneracyjnych. Natomiast z punktu widzenia terapii tego typu nowotworu układu nerwowego (nerwiak płodowy - *neuroblastoma*) obserwowane efekty, czyli wyższa przeżywalność komórek, niższa apoptoza, wzrost ekspresji białek o właściwościach neuroprotekcyjnych byłyby bardzo niekorzystne.

Przedmiotem dalszych badań doktorantki były funkcjonalne konsekwencje wiązania piceatannolu do dehydrogenazy GAPDH, a ich wyniki przedstawione zostały w pracy pt. *Functional consequences of piceatannol binding to glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase* opublikowanej w 2018 r w czasopiśmie *PLOS One* (IF=2,766). W badaniach oddziaływania piceatannolu z enzymem (w roztworze) zastosowano wiele różnorodnych technik eksperymentalnych, takich jak: izotermiczna kalorymetria miareczkowa, pomiary potencjału Zeta, dichroizm kołowy, pomiary agregacji metodą fluorescencyjną z wykorzystaniem czytnika mikroplitek, mikroskopia elektronowa, modelowanie molekularne i in. Te ciekawe i ważne badania pokazały wiązanie piceatannolu do centrum aktywnego GAPDH powodujące blokowanie reszt cysteinowych. Pomimo, że wiązanie piceatannolu w centrum aktywnym enzymu powoduje obniżenie jego aktywności, może to mieć korzystne konsekwencje dla losu komórki. Piceatannol blokując reszty cysteiny zapobiega ich oksydacyjnym modyfikacjom prowadzącym do agregacji GAPDH. Badania potwierdziły, że piceatannol znacznie obniża poziom agregacji enzymu wywołanej stresem oksydacyjnym. Należy wspomnieć, że znacznie słabszy efekt ochronny w porównaniu z piceatannolem zaobserwowano przy pre-inkubacji enzymu z szerzej znanym rezweratolem.

Uzyskane wyniki są bardzo istotne, biorąc pod uwagę fakt, że rolę agregacji GAPDH jako głównego czynnika śmierci komórek potwierdzono w innych w modelach chorób

neurodegeneracyjnych. W warunkach stresu oksydacyjnego badany enzym ulega translokacji do jądra komórkowego, wywoływany jest też proces apoptozy. Wyniki uzyskane w ramach badań nad wpływem piceatannolu na właściwości funkcjonalne i strukturalne dehydrogenazy mogą przyczynić się do opracowania nowej strategii postępowania w przypadku zaburzeń neurologicznych wynikających z agregacji dehydrogenazy GAPDH.

W najnowszej pracy z cyklu prac doświadczalnych Doktorantki opublikowanej ponownie w *Journal of Functional Foods* (2019), IF=3,767, przedstawione zostały rozszerzone, w stosunku do prowadzonych wcześniej na układzie modelowym, badania oddziaływania piceatannol–enzym GAPDH. Doktorantka skoncentrowała w nich nad badaniem oddziaływania piceatannolu z dehydrogenazą GAPDH w embrionalnych mysich komórkach hipokampa (linia mHippoE-18). W badaniach tych zastosowano różnorodne metody eksperymentalne: mikroskopię konfokalną, cytometrię przepływową, analizę western blot. Określony też został wpływ piceatannolu na mRNA sirtuiny 1, a także na aktywność enzymów związanych ze stresem oksydacyjnym. Ważnym wynikiem tych badań było wykazanie, że również w przypadku komórek hipokampa mHippoE-18 preinkubacja z piceatannolem może zapobiegać agregacji dehydrogenazy GAPDH wywołanej przez H_2O_2 i translokacji tego enzymu do jądra komórkowego, co jak pokazano wynika z bezpośredniego wiązania tej pochodnej stilbenu z enzymem.

Zaproponowany przez Doktorantkę molekularny mechanizm ochronnego wpływu piceatannolu na komórki nerwowe przed ich uszkodzeniem przez stres oksydacyjny uzasadniają również wyniki badań innych autorów wskazujące, że oksydacyjnie zmodyfikowana dehydrogenaza GAPDH odgrywa zasadniczą rolę w rozwoju chorób neurodegeneracyjnych.

Na podkreślenie zasługuje zastosowanie przez Doktorantkę w swoich badaniach wielu różnorodnych technik eksperymentalnych, takich jak; metody spektroskopowe, mikroskopowe, mikrokalorymetryczne, techniki biologii molekularnej, metody modelowania molekularnego i in.

Do najważniejszych wyników uzyskanych przez Doktorantkę należy wykazanie ochronnego wpływu piceatannolu na procesy neurodegeneracyjne przebiegające w badanych komórkach nerwowych w warunkach stresu oksydacyjnego z udziałem zmienionej strukturalnie dehydrogenazy GAPDH.

Z uwagi na przypuszczalną rolę tej dehydrogenazy w genezie i progresji chorób neurodegeneracyjnych badania nad wpływem nietoksycznych związków pochodzenia naturalnego na wymienione wyżej procesy należy uznać za w pełni uzasadnione. Cele pracy były bardzo ambitne. Na podkreślenie zasługuje wielość wątków podjętych w badaniach. Uzyskane wyniki badań nad neuroprotektoryjnymi właściwościami piceatannolu mogą istotnie przyczynić się do opracowania nowych strategii ochrony komórek neuronalnych przed postępującymi procesami

degeneracyjnymi. Tematykę badań prowadzonych przez doktorantkę należy uznać za obszar badawczy o potencjalnie dużym znaczeniu klinicznym.

Spośród trzech prac **przeglądowych** włączonych do pracy doktorskiej w dwóch z nich Doktorantka jest pierwszym autorem.

W pracy przeglądowej (*Postępy Biologii Komórki*, 2014, J. Gerszon i wsp.) przedstawione zostały mechanizmy antyoksydacyjnego działania rezweratrolu, związku z grupy pochodnych stilbenu. Związek ten występuje w kilkudziesięciu roślinach, szczególnie obficie w ciemnych winogronach, ale także w innych owocach o ciemnej skórce. W pracy tej omówiona została jego rola w prewencji chorób neurodegeneracyjnych. Zaproponowany też został molekularny mechanizm działania rezweratrolu obejmujący hamowanie agregacji peptydów i białek zaangażowanych w procesy neurodegeneracyjne oraz aktywację sirtuin, szczególnie sirtuiny 1.

Kolejna praca przeglądowa, opublikowana w *Radiation Physics and Chemistry*, 2016, A. Rodacka, J. Gerszon, M. Puchała, G. Bartosz, IF=1.369) zawiera wyczerpujące omówienie molekularnych mechanizmów inaktywacji enzymów przez promieniowanie jonizujące, w tym w szczególności mechanizmu inaktywacji dehydrogenaz.

Szczególną uwagę należy zwrócić na pracę przeglądową autorstwa J. Gerszon i A. Rodackiej opublikowaną w czasopiśmie *Ageing Research Reviews* (2018) o bardzo wysokim współczynniku wpływu IF=8.974. W pracy tej bardzo wyczerpująco opisana została oksydacyjna modyfikacja dehydrogenazy aldehydu 3-fosfoglicerynowego (GAPDH) występująca w procesach neurodegeneracyjnych oraz rola związków niskocząsteczkowych w zapobieganiu agregacji tego enzymu i jego translokacji do jądra komórkowego.

Powyższe prace przeglądowe wyczerpująco omawiają problem molekularnych mechanizmów degeneracji komórek nerwowych w wyniku działania stresu oksydacyjnego ze szczególnym uwzględnieniem roli dehydrogenazy GAPDH w tym procesie oraz wyniki badań nad możliwościami ograniczenia tej degeneracji, m.in. przez wykorzystanie związków pochodzenia naturalnego z grupy pochodnych stilbenu.

Dorobek naukowy doktorantki, oprócz prac włączonych do omawianego cyklu publikacji stanowiącego podstawę ubiegania się o stopień doktora, obejmuje dodatkowo jeszcze 4 publikacje, w tym dwie z nich opublikowane zostały w czasopismach z *Impact Factor* (1.07 i 0.783), a także znaczną liczbę komunikatów zjazdowych (6 w postaci prezentacji ustnych i 17 w postaci posterów) przedstawianych na zjazdach krajowych i zagranicznych.

Pod względem wskaźników bibliometrycznych całkowity dorobek naukowy Doktorantki należy uznać za bardzo dobry i upoważniający do ubiegania się przez nią o stopień doktora.

Biorąc pod uwagę szeroki zakres przeprowadzonych badań oraz ich bardzo interesujące wyniki o potencjalnym znaczeniu klinicznym, opublikowane w dobrych czasopismach z listy Filadelfijskiej, należy uznać, że cel pracy doktorskiej został osiągnięty.

Reasumując, pracę doktorską Pani mgr Gerszon oceniam bardzo wysoko. Stwierdzam też, że przedstawiona mi do oceny rozprawa spełnia kryteria i warunki stawiane rozprawom doktorskim określone w obowiązującej Ustawie o Stopniach Naukowych i Tytule Naukowym i przedkładam Wysokiej Radzie Wydziału wniosek o dopuszczenie Pani mgr Gerszon do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Składam również wniosek o nagrodzenie pracy doktorskiej.

Prof. dr hab. Krystyna Michalak

