



Prof. dr hab. Aneta Koceva-Chyła
Katedra Biofizyki Medycznej
Instytut Biofizyki
ul. Pomorska 141/143 90-237 Łódź
Tel: +48 506 421 367
E-mail: aneta.koceva@biol.uni.lodz.pl; koceva.aneta@gmail.com

6 września 2023 r.

RECENZJA

Pracy doktorskiej mgr inż. Natalii Pieńkowskiej pt.:

„Modyfikacja przedwczesnego starzenia się komórek *in vitro* i stresu oksydacyjnego w komórkowych modelach chorób neurodegeneracyjnych przez wybrane antyoksydanty”

wykonanej w Pracowni Biochemii Analitycznej
Uniwersytetu Rzeszowskiego

Promotor: prof. dr hab. Izabela Sadowska-Bartosz

1. Podstawa prawna i formalna opracowania recenzji

Podstawą formalną opracowania recenzji jest pismo Prorektora ds. Kolegium Nauk Przyrodniczych Uniwersytetu Rzeszowskiego w Rzeszowie, Pani dr hab. Idalii Kasprzyk z dnia 7 sierpnia 2023 r., w sprawie powierzenia mi obowiązków recenzenta w postępowaniu doktorskim mgr inż. Natalii Pieńkowskiej, ubiegającej się o nadanie stopnia naukowego doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne. Powołanie na recenzenta w przewodzie doktorskim nastąpiło zgodnie z Uchwałą nr 181/07/2023 Kolegium Nauk Przyrodniczych Uniwersytetu Rzeszowskiego w Rzeszowie na posiedzeniu w dniu 24 lipca 2023 r. Jako recenzent oświadczam, że nie znajduję się w sytuacji konfliktu interesów i nie posiadam z mgr inż. Natalią Pieńkowską wspólnych publikacji, nie prowadzę wspólnych badań naukowych i nie pozostaję w zależności służbowej.

Recenzję przygotowano w oparciu o następującą dokumentację:

- a) kopię pracy doktorskiej mgr inż. Natalii Pieńkowskiej,
- b) wykaz dorobku naukowego:
 - publikacje wchodzące w skład rozprawy doktorskiej wraz z analizą bibliometryczną,
 - pozostałe publikacje wraz z analizą bibliometryczną,
 - komunikaty zjazdowe,
- c) informację o udziale w grantach badawczych,
- d) informację o źródłach finansowania badań wykonanych w ramach pracy doktorskiej,
- e) oświadczenia współautorów, dotyczące ich procentowego udziału w publikacjach wchodzących w skład rozprawy doktorskiej,

f) kopie publikacji naukowych wchodzących w skład rozprawy doktorskiej.

2. Ocena bibliometryczna publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej

Rozprawa doktorska mgr inż. Natalii Pieńkowskiej składa się z czterech powiązanych tematycznie oryginalnych prac eksperymentalnych, opublikowanych w specjalistycznych czasopismach naukowych z listy filadelfijskiej, o wysokich współczynnikach oddziaływania (**IF=2,349–6,208**) – *Aging, Acta Biochimica Polonica, International Journal of Molecular Sciences, Polymers*. Są to wartościowe i interesujące publikacje wieloautorskie, opublikowane w okresie 2020-2023 r. w czasopismach z listy JCR, o łącznym **IF=19,206 (MEiN=450 pkt.)** (wg bazy *ISI Journal Citation Report* oraz wykazu czasopism naukowych i recenzowanych materiałów z konferencji międzynarodowych Ministerstwa Edukacji i Nauki z 2023 r.). Ich tematyka wpisuje się w światowe trendy badawcze o potencjalnie dużym znaczeniu klinicznym. **Doktorantka jest pierwszym autorem w pracach 1-3, opublikowanych w 2020 roku i drugim autorem w pracy 4, opublikowanej w 2023 roku.**

3. Udział Doktorantki w powstawaniu publikacji stanowiących przedmiot Jej pracy doktorskiej

Na podstawie pisemnych oświadczeń współautorów, udział mgr inż. Natalii Pieńkowskiej w publikacjach 1, 2 i 3 należy uznać za dominujący (odpowiednio 55%, 50% i 50%) w stosunku do udziału pozostałych współautorów: 3%-25% (**publikacja 1**), 10%-40% (**publikacja 2**) i 5%-19% (**publikacja 3**). Jej udział w publikacji 4 jest mniejszy (20%) niż udział pierwszego i trzeciego współautora (30%), ale większy niż udział pozostałych trzech współautorów (1%, 6% i 13%). Zauważalna jest pewna nieścisłość w oświadczeniu trzeciego współautora publikacji 4, który określił swój udział procentowy jako większy (30%) niż udział Doktorantki (20%), która jest drugim współautorem pracy. Podobne nieścisłości w deklaracjach procentowego udziału współautorów występują w przypadku publikacji 1, w której trzeci współautor zadeklarował dwukrotnie większy udział (10%) niż drugi współautor (5%), oraz w publikacji 2, w której czwarty współautor zadeklarował większy udział (5%) niż trzeci współautor (3%). Tę drobną uwagę zamieszczam jedynie z obowiązku recenzenta, gdyż wymienione nieścisłości nie wpływają na wartość merytoryczną publikacji.

4. Finansowanie badań stanowiących przedmiot pracy doktorskiej

Doktorantka prowadziła częściowo swoje badania w ramach grantów OPUS 9 (nr grantu: NCN 2015/17/B/NZ3/03731, kierownik grantu: Prof. dr hab. Grzegorz Bartosz), oraz SONATA BIS (nr. grantu: NCN 2016/22/E/NZ7/00641, kierownik grantu: Prof. dr hab. Izabela Sadowska-Bartosz), korzystając w części z funduszy tych grantów (**prace 1-3**). Dodatkowym źródłem finansowania badań był grant SONATA BIS 10 (nr. grantu: NCN 2020/38/E/ST4/00046, kierownik grantu: Dr Paweł Chmielarz, grant *Canadian Institutes of Health Research #PJT-159493* (**publikacja 3**) oraz środki na utrzymanie potencjału

badawczego Laboratorium Biochemii Analitycznej Uniwersytetu Rzeszowskiego, przyznane przez Uniwersytet Rzeszowski (**publikacja 4**).

5. Współpraca naukowa

Współpraca naukowa Mgr inż. Natalii Pieńkowskiej z kilkoma ośrodkami krajowymi (Katedra Chemii Fizycznej Politechniki Rzeszowskiej, Katedra Biofizyki Molekularnej Uniwersytetu Łódzkiego, Centrum Dydaktyczno-Badawcze Mikroelektroniki i Nanotechnologii Uniwersytetu Rzeszowskiego) oraz z *Department of Psychiatry and Behavioural Neuroscience McMaster University* w Kanadzie, znacząco wzbogaciła metodologicznie i naukowo publikacje zawarte w Jej rozprawie doktorskiej.

6. Ocena merytoryczna rozprawy doktorskiej

Badania realizowane przez Doktorantkę są ambitne i aktualne, a otrzymane wyniki wnoszą nową wiedzę do prezentowanej dziedziny. Obserwowany od lat wzrost długości życia wraz z rozwojem medycyny oraz nauk medycznych i biologicznych, skutkuje m.in. postępującym starzeniem się populacji ludzkiej oraz rosnącą liczbą chorób przewlekłych i neurodegeneracyjnych. Czołowe miejsca wśród nich zajmują choroba Parkinsona i choroba Alzheimerera. Biorąc pod uwagę progresywny wzrost odsetka osób w podeszłym wieku w populacji, należy oczekiwać, że częstość tych chorób będzie wzrastać i stanowić coraz większy problem kliniczny.

Mechanizmy procesów neurodegeneracyjnych są skomplikowane i wieloczynnikowe i obejmują zarówno czynniki genetyczne i przewlekłe procesy zapalne, prowadzące do aktywacji cytokin i mikrogleju, jak i środowiskowe czynniki toksyczne (promieniowanie UV, H₂O₂, stres oksydacyjny). Zapobieganie procesowi przedwczesnego starzenia się komórek organizmu, zatrzymanie postępujących z wiekiem zmian neurodegeneracyjnych i łagodzenie ich skutków poprzez opracowanie skutecznej terapii, stanowi jedno z większych wyzwań współczesnej medycyny, neurobiologii i biologii molekularnej.

Stres oksydacyjny uważany jest za jedną z głównych przyczyn przedwczesnego starzenia się komórek i rozwoju patologicznych zmian odpowiedzialnych za rozwój chorób neurodegeneracyjnych. W ostatnich latach jego wpływ na procesy neurodegeneracyjne stał się jednym z najważniejszych i najbardziej atrakcyjnych kierunków badawczych, co uzasadnia podjęcie tej tematyki badawczej przez Doktorantkę i świadczy o aktualności Jej badań.

Głównym celem badań realizowanych w pracy doktorskiej była ocena modyfikującego wpływu naturalnych i syntetycznych związków o potencjalnej aktywności przeciwutleniającej na stres oksydacyjny generowany *in vitro* w komórkowych modelach przedwczesnego starzenia się komórek prawidłowych, choroby Parkinsona i choroby Alzheimerera. Dodatkowym celem badań była ocena biokompatybilności i bezpieczeństwa w stosowaniach terapeutycznych nowych amfifilowych nanoform stabilnych rodników nitroksylowych jako antyoksydanty nowej generacji o potencjalnym działaniu terapeutycznym. Sześcioczłonowe piperidynowe nanonitroksydy nie były dotychczas

badane w tym aspekcie, co stanowi nowatorski element badań.

Podstawą hipotezy badawczej weryfikowanej przez Doktorantkę w **pracach 1-3**, było założenie, że wybrane do analizy naturalne i syntetyczne związki o potencjale antyoksydacyjnym, poprzez wzmocnienie obrony antyoksydacyjnej komórki i modyfikację molekularnych mechanizmów negatywnego oddziaływania stresu oksydacyjnego, będą działać ochronnie i zapobiegać lub spowalniać procesy starzeniowe i neurodegeneracyjne wywoływane przez stres oksydacyjny *in vitro* w komórkowych modelach przedwczesnego starzenia i chorób neurodegeneracyjnych (choroby Parkinsona i choroby Alzheimerera). Hipoteza badawcza weryfikowana w **publikacji 4** zakładała natomiast lepsze właściwości antyoksydacyjne, większą skuteczność i biokompatybilność nowych nanoform nitroksydów w porównaniu z wolnymi nitroksydami.

W badaniach indukowanego starzenia (**publikacja 1**) wykorzystano dwie linie fibroblastów – komercyjnie dostępną linię MRC-5, wyprowadzoną z fibroblastów skóry 14-tygodniowego płodu płci męskiej, oraz linię H8F2p25LM pierwotnych fibroblastów, wyizolowanych ze skóry ucha dorosłego dawcy, udostępnioną przez Dr J. Srokę z Zakładu Biologii Komórki Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie. Dużym plusem wybranych linii fibroblastów w tym modelu okazała się ich różna wrażliwość na czynniki prooksydacyjne (H₂O₂), wynikająca z różnej zawartości endogennej katalazy.

W badaniach chorób neurodegeneracyjnych użyto komercyjnie dostępnej linii SH-SY5Y, wyprowadzonej z komórek nerwiaka zarodkowego pochodzącego z przerzutowego nowotworu kości 4-letniego pacjenta (komórkowy model choroby Parkinsona, **publikacja 2**) oraz jej transfekowanej odmiany SH-SY5Y(hTau40) wykazującej nadekspresję ludzkiego białka *tau*, po transfekcji do wektora pcDNA3.2/V/DEST jego najdłuższej izoformy, zawierającej cztery powtórzenia (komórkowy model choroby Alzheimerera, **publikacja 3**).

Stres oksydacyjny w modelach komórkowych indukowano przez inkubację komórek ze związkami chemicznymi o udowodnionym działaniu prooksydacyjnym: nadtlakiem wodoru (H₂O₂) (**publikacja 1**) i nadtlakiem 6-hydroksydopaminy (6-OHDA) (**publikacja 2**). W komórkowym modelu choroby Alzheimerera stres oksydacyjny w komórkach neuroblastomy wywoływano przez nadekspresję i agregację białka *tau*, które odpowiada za występowanie wielu chorób o podłożu neurodegeneracyjnym (**publikacja 3**).

Wybór nadtlaku wodoru do indukcji przedwczesnego starzenia się fibroblastów w modelu komórkowym SIPS (*ang. Stress Induced Premature Senescence*) jest uzasadniony, gdyż H₂O₂ został wcześniej zweryfikowany przez innych autorów jako najefektywniejszy stresogenny induktor przedwczesnego starzenia się fibroblastów. Wykazano, że fibroblasty, w których wywołano przedwczesne starzenie przy użyciu H₂O₂, wykazują wiele wspólnych cech z fizjologicznym starzeniem replikacyjnym (pojawienie się markerów starzenia, hipertrofia komórek i organelli komórkowych, itp., oraz spadek aktywności niektórych enzymów). Przedwczesne starzenie indukowane H₂O₂ może

imitować procesy naturalnego utleniania zachodzące w warunkach *in vivo*. H₂O₂ łatwo przenika przez błonę komórkową. W reakcji Fentona, w obecności jonów Fe²⁺ oraz Cu²⁺ H₂O₂, może ulec przekształceniu w bardzo reaktywny rodnik hydroksylowy, który powoduje peroksydację lipidów, karbonylację białek oraz uszkodzenia zasad azotowych kwasów nukleinowych.

Stres oksydacyjny w komórkowym modelu choroby Parkinsona generowano oksydopaminą (6-OHDA), która jest bardzo dobrym wyborem, gdyż wywołuje silny stres oksydacyjny w komórkach nerwowych na skutek peroksydacji lipidów, karbonylacji białek i oksydacyjnych uszkodzeń DNA. Wymienione uszkodzenia zwiększają status oksydacyjny komórek oraz niszczą selektywnie dopaminergiczne i noradrenergiczne neurony w mózgu. 6-OHDA obniża również całkowitą zdolność antyoksydacyjną komórki, powodując spadek aktywności głównych enzymów antyoksydacyjnych (manganowej dysmutazy ponadtlenkowej i katalazy).

Wysoko oceniam wszystkie badania, wykonane w pracy doktorskiej (**publikacje 1-4**). Dostarczyły one nowe interesujące wyniki na temat roli stresu oksydacyjnego w przedwczesnym starzeniu się komórek i patogenezie procesów neurodegeneracyjnych. Badania zostały zaplanowane i wykonane bardzo starannie. Zwraca uwagę bardzo dokładny opis stosowanych odczynników, metod i procedur oraz bogaty warsztat metodyczny. Poszczególne analizy zostały wykonane skrupulatnie, z użyciem nowoczesnej aparatury pomiarowej i z dużą dbałością o odpowiednie próby kontrolne. Doktorantka przeprowadziła dogłębną analizę statusu oksydacyjnego komórek, cytotoksyczności i właściwości antyoksydacyjnych testowanych związków, uwzględniając w oznaczeniach szeroki panel ważnych parametrów stresu oksydacyjnego, markery starzenia, tworzenie agregatów białka *tau* i inne niezbędne analizy. W badaniach zastosowano szeroki zakres stężeń badanych związków i czasu ich działania na komórki oraz przeprowadzono rzetelną analizę statystyczną wyników w celu prawidłowej ewaluacji istotności stwierdzonych zmian. Chciałabym podkreślić wysoką estetykę starannie wykonanych wykresów prezentowanych wyników. Należy również docenić szeroką i kompetentną dyskusję wyników uzyskanych w badaniach.

Bardzo ciekawe są badania wykonane w komórkowym modelu choroby Parkinsona (**publikacja 2**), w których Doktorantka wykonała szczegółową analizę stanu redoks komórek neuroblastomy inkubowanych z katecholaminergiczną neurotoksyną 6-OHDA. Oznaczenia całkowitej zdolności antyoksydacyjnej komórek, zawartości: reaktywnych form tlenu (RFT), zredukowanego i utlenionego glutationu oraz enzymów związanych z metabolizmem glutationu (peroksydazy glutationowej, reduktazy glutationowej, transferazy glutationowej i ligazy γ -glutamylcysteiny) wykazały zaburzenia homeostazy redoks w komórkach neuroblastomy traktowanych 6-OHDA i obniżenie wywołanego stresu oksydacyjnego przez sześciocząłony nitroksyd piperydynowy 4-amino Tempo (4-AT), głównie przez redukcję poziomu reaktywnych form tlenu. Niskie stężenia 6-OHDA paradoksalnie powodowały wzrost stężenia GSH, co

zdaniem Doktorantki może być związane z odpowiedzią komórek na stres oksydacyjny indukowany przez 6-OHDA oraz ze zwiększoną aktywnością enzymów metabolizujących glutation. Protekcyjny efekt 4-amino Tempo (4-AT) w komórkach neuroblastomy obserwowano również w przypadku stresu oksydacyjnego indukowanego w komórkowym modelu choroby Alzheimera przez agregację białka tau.

Jednym z najważniejszych procesów związanych ze stresem oksydacyjnym, starzeniem i patogenezą chorób neurodegeneracyjnych, w których dodatkowo dochodzi do utraty połączeń synaptycznych, jest postępująca dysfunkcja mitochondriów. Dlatego szczegółowe analizy sieci mitochondrialnej w komórkowych modelach przedwczesnego starzenia, choroby Parkinsona i choroby Alzheimera wykonane przez Doktorantkę w pracy doktorskiej (masa mitochondriów, transbłonowy potencjał mitochondrialny, poziom mitochondrialnego rodnika ponadtlenkowego) uważam za jedne z najważniejszych wyników. Badania te dostarczyły interesujące dane na temat mechanizmów oddziaływania stresu oksydacyjnego oraz naturalnych i syntetycznych antyoksydantów na sieć mitochondrialną w komórkowych modelach przedwczesnego starzenia i chorób neurodegeneracyjnych.

Za wartościowe i obiecujące uważam również wyniki dotyczące nowych amfifilowych nanoform rodników nitroksylowych **publikacja 4**) i zachęcam Autorów do ich dalszej analizy w badaniach przedklinicznych pod kątem zastosowania terapeutycznego. Nanonitroksydy wydają się dobrą alternatywą dla wolnych nitroksydów. Jak wykazano w **publikacji 4** są one bardziej stabilne w komórce niż wolne nitroksydy, wykazują silniejsze właściwości przeciwutleniające, nie są cytotoksyczne dla komórek prawidłowych i nie powodują hemolizy erytrocytów.

Podsumowując, badania wykonane w rozprawie doktorskiej dostarczają wiele istotnych wyników na temat zmian spowodowanych przez stres oksydacyjny, generowany przez czynniki stresogenne *in vitro* w komórkowych modelach indukowanego starzenia (H₂O₂), choroby Parkinsona (oksydopamina, 6-OHDA) i choroby Alzheimera (nadekspresja i agregacja patologicznego białka *tau*) oraz różnej efektywności naturalnych i syntetycznych antyoksydantów w obniżeniu jego efektów cytotoksycznych.

Mam duże uznanie dla benedyktyńskiej pracy eksperymentalnej wykonanej przez Doktorantkę – imponującej liczby analiz i pomiarów, zaprojektowania modelu indukowanego starzenia i jego przystosowania do linii fibroblastów stosowanych w eksperymentach, itp. Doktorantka przetestowała efekt przeciwutleniający 13 syntetycznych i naturalnych antyoksydantów w szerokim zakresie ich stężeń (1-100 μM), w tym aktywność pochodnych nitroksylowych Tempo, 4-Amino-Tempo i 4-hydroksy-Tempo). Przed analizą aktywności przeciwutleniającej testowanych antyoksydantów wykonała dużo wstępnych oznaczeń dotyczących profilu cytotoksyczności H₂O₂, czasu jego połowicznego rozpadu i aktywności katalazy. Fibroblasty linii H8F2p25LM, wyizolowane ze skóry ucha okazały się ponad 100 razy bardziej wrażliwe na czynnik stresogeny (H₂O₂) niż fibroblasty linii MRC-5

wyizolowane z płuc. Czas połowicznego rozpadu H₂O₂ natomiast był ok. 7-krotnie dłuższy w bardziej wrażliwych fibroblastach linii H8F2p25LM, co wynikało z 11-krotnie większej aktywności katalazy w fibroblastach linii MRC-5. Analiza profilu cytotoksyczności antyoksydantów w zakresie stężeń 1-100 μM, nie wykazała cytotoksycznego wpływu na żywotność fibroblastów. Jedynie kurkumina w najwyższym ze stosowanych stężeń (100 μM) przejawiała toksyczne działanie. W doświadczeniach nad ochronnym wpływem antyoksydantów na proces starzenia indukowanego wtórną sygnalizacją zależną od utleniaczy i prowadzącego do obniżenia przeżywalności komórek, wykazano, że przeciwutleniający efekt antyoksydantów wykazywał silną zależność od miejsca ich pochodzenia, stosowanego stężenia i czasu inkubacji z komórkami. Za najważniejszy wynik tej części badań uważam wykazanie, że wtórnie wytwarzane reaktywne formy tlenu nie są zaangażowane w proces przedwczesnego starzenia się fibroblastów wywołanego przez H₂O₂, a słabe działanie ochronne przetestowanych syntetycznych i naturalnych przeciwutleniaczy wynika głównie z ich oddziaływania na mitochondria. Antyoksydanty, w zakresie stężeń (1-100 μM) nie wykazywały cytotoksyczności wobec prawidłowych fibroblastów, ale też nie przejawiały działania przeciwstarzeniowego, nie powodowały spadku liczby komórek wykazujących obecność markera starzenia i nie wpływały na pulę wewnątrzkomórkowego glutationu.

Istotnym wynikiem badań na komórkowych modelach chorób neurodegeneracyjnych w pracy doktorskiej jest udowodnienie przez Doktorantkę związku między nadekspresją i agregacją patologicznego białka *tau* a indukowanym *in vitro* stresem oksydacyjnym w modelowym układzie komórkowym choroby Alzheimerera.

Wniosek końcowy

Przedstawioną mi do oceny rozprawę doktorską mgr inż. Natalii Pieńkowskiej oceniam bardzo wysoko. Publikacje wchodzące w skład rozprawy zawierają wartościowe wyniki dotyczące procesu starzenia oraz chorób neurodegeneracyjnych. Badania, w których Doktorantka ma największy udział, wykonano bardzo rzetelnie, z wykorzystaniem nowoczesnych technik analitycznych.

Mgr inż. Natalia Pieńkowska jest pierwszym autorem większości prac (1-3) oraz drugim autorem pracy 4. Ma duży wkład w wykonanie badań i przygotowanie manuskryptów.

Wysoko oceniam również dorobek publikacyjny mgr inż. Natalii Pieńkowskiej, Jej aktywność naukową i udział w grantach badawczych. Pragnę wyrazić uznanie dla konsekwentnego dążenia Doktorantki do systematycznego pogłębiania wiedzy i podnoszenia jakości własnych badań poprzez udział w kongresach, sympozjach i konferencjach naukowych, prezentowanie wyników swoich badań na forum krajowym i międzynarodowym oraz rozwijanie współpracy z polskimi i zagranicznymi ośrodkami naukowymi.

Uważam, że rozprawa doktorska mgr inż. Natalii Pieńkowskiej spełnia warunki i kryteria stawiane rozprawom doktorskim w art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595, z późn. zm.) i z dużą przyjemnością przedkładam Wysokiej Radzie Wydziału wniosek o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Biorąc pod uwagę aktualność podjętej tematyki badawczej, zakres i wysoką jakość badań, ich nowatorski charakter, potencjalne znaczenie kliniczne i potencjał aplikacyjny, wnoszę również o wyróżnienie rozprawy doktorskiej.



Prof. dr hab. Aneta Koceva-Chyła