



nencki institute
of experimental biology

POLISH ACADEMY OF SCIENCES
NENCKI INSTITUTE OF EXPERIMENTAL BIOLOGY

Pasteur 3, 02-093 Warsaw, Poland
Phone: (48-22) 589 22 07; Fax: (48-22) 822 53 42
E-mail: sekretariat@nencki.edu.pl; <http://www.nencki.gov.pl>

Prof. dr hab. Mariusz R. Więckowski,
Pracownia Biologii Mitochondriów i Metabolizmu
Instytut Biologii Doświadczalnej PAN
im. M. Nenckiego w Warszawie

Warszawa, 17 czerwca 2021 r.

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr **Moniki Pichli**

p.t.: " Ocena potencjalnych substancji terapeutycznych na modelu komórkowym w chorobach wieku podeszłego"

wykonanej pod kierunkiem prof. dr hab. Izabeli Sadowskiej-Bartosz.

Celem pracy doktorskiej mgr Moniki Pichli było poznanie właściwości wybranych nanocząstek o potencjale antyoksydacyjnym, jako potencjalnie użytecznych w terapii chorób neurodegeneracyjnych, na modelu komórkowym choroby Parkinsona. Zagadnienie, nad którym pracowała Doktorantka uważam za niezmiernie ważne, a wyniki, przedstawione w opublikowanych przez nią pracach eksperymentalnych za istotne i prowadzące do poszerzenia naszej wiedzy na temat terapii ukierunkowanych na łagodzenie stresu oksydacyjnego i nitracyjnego występującego w chorobach neurodegeneracyjnych.

Formalny opis rozprawy

Recenzowana rozprawa doktorska składa się z 14 rozdziałów: (I) Informacji wprowadzających, zawierających informacje o finansowaniu badań oraz współpracy naukowej w ramach wykonywania pracy doktorskiej, (II i III) streszczeń w języku polskim i angielskim, (IV) wykazu skrótów używanych w autoreferacie, (V) wstępu, (VI) celu i zakresu pracy, (VII) listy publikacji naukowych wchodzących w skład rozprawy doktorskiej, (VIII) części opisujących materiały i metody, (IX) wyników badań, (X) podsumowania, (XI) literatury, (XII) dorobku naukowego doktorantki, (XIII) oświadczeń współautorów, oraz (XIV) załączonych publikacji obejmujących wyniki omawiane w rozprawie doktorskiej.

Na przedstawioną do recenzji pracę doktorską mgr Moniki Pichli pt. "Ocena potencjalnych substancji terapeutycznych na modelu komórkowym w chorobach wieku podeszłego", składają się cztery tematycznie spójne artykuły opublikowane w latach 2020 i 2021. Należy podkreślić, że wszystkie te prace zostały opublikowane w czasopismach z listy JCR o wysokich współczynnikach wpływu i dużej liczbie punktów MNiSW. Na cykl prac składają się trzy prace doświadczalne opublikowane w czasopismach: *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, *Molecules* oraz *Analytical Biochemistry* i jedna praca przeglądowa opublikowana w *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*.

Na przedstawiony cykl prac, wchodzących w skład rozprawy doktorskiej, składają się następujące publikacje:

1. **Pichla M.**, Bartosz G., Sadowska-Barotsz I., The anti-aggregative and anti-amyloidogenic properties of nanoparticles: a promising tool for the treatment and diagnostics of neurodegenerative diseases. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2020, 3534570.
2. **Pichla M.**, Pułaski Ł., Kania KD., Stefaniuk I., Cieniek B., Pieńkowska N., Bartosz G., & Sadowska-Bartosz I. Nitroxide Radical-Containing Redox Nanoparticles Protect Neuroblastoma SH-SY5Y Cells against 6-Hydroxydopamine Toxicity. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2020, 9260748.
3. **Pichla, M.**; Bartosz, G.; Stefaniuk, I.; Sadowska-Bartosz, I. pH-Responsive Redox Nanoparticles Protect SH-SY5Y Cells at Lowered pH in a Cellular Model of Parkinson Disease. *Molecules* 2021, 26, 543.
4. **Pichla M**, Bartosz G, Pieńkowska N, Sadowska-Bartosz I. Possible artefacts of antioxidant assays performed in the presence of nitroxides and nitroxide-containing nanoparticles. *Analytical Biochemistry* 2020; 597:113698.

Na podkreślenie zasługuje fakt, że we wszystkich publikacjach wchodzących w skład rozprawy doktorskiej, mgr Monika Pichla jest pierwszym autorem.

Rolą recenzenta jest merytoryczna ocena wyników uzyskanych przez Doktorantkę, jak i sposobu ich prezentacji. Jest to łatwiejsze w przypadku klasycznej formy rozprawy doktorskiej. W tym jednak przypadku mam do czynienia z cyklem opublikowanych przez doktorantkę publikacji, które zostały już ocenione przez redakcje czasopism oraz międzynarodowej klasy specjalistów w tej dziedzinie występujących w roli recenzentów, dlatego też w swojej ocenie skoncentruje się na ocenie części opisowej autoreferatu. Sam fakt, że wszystkie prace wchodzące w skład rozprawy doktorskiej mgr Moniki Pichli zostały opublikowane w anglojęzycznych czasopismach z listy filadelfijskiej (dwóch prac w *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* IF = **5.076**; *Molecules* IF = **3.267** oraz *Analytical*

Biochemistry IF = **2.877**) których sumaryczny Impact Factor w roku opublikowania jest równy 16.296, a liczba punktów MNiSW wynosi 370 wskazuje na ich wysoką wartość naukową.

Ocena udziału mgr Moniki Pichli w powstanie wyżej wymienionych artykułów po części możliwa była dzięki załączonym oświadczeniom pozostałych współautorów. Na ich podstawie i po przeanalizowaniu udziału mgr Moniki Pichli w wyżej wymienionych publikacjach mogę stwierdzić, że odegrała ona kluczową rolę w ich powstaniu. Chciałbym jednakże nadmienić, że w przypadku takiej formy rozprawy doktorskiej, recenzent może/powinien oceniać i dyskutować jedynie wyniki otrzymane przez doktoranta, a nie przez pozostałych współautorów. Z przedstawionych oświadczeń, niestety, nie wynika, które dokładnie wyniki/przedstawione ryciny w publikacjach były otrzymane/wykonane przez Doktorantkę. W związku z tym, bardzo bym chciał usłyszeć od Doktorantki więcej szczegółów dotyczących tej kwestii. Doktorantka, podczas obrony, powinna szczegółowo przedstawić swój udział w uzyskaniu wyników wykorzystanych do przygotowania figur i rycin zamieszczonych w publikacjach wchodzących w skład jej rozprawy doktorskiej. Chciałbym podkreślić, że komentarz ten w żaden sposób nie umniejsza wagi osiągnięcia naukowego mgr. Moniki Pichli, a jedynie ma na celu wyjaśnienie kwestii, która powinna być na tyle jasno opisana, aby recenzenci mogli z pełnym przekonaniem stwierdzić, że oceniane osiągnięcie naukowe w postaci cyklu publikacji jest w znaczącej mierze osiągnięciem Doktorantki.

Wstęp zawarty w rozprawie doktorskiej został napisany rzeczowo i w bardzo przemyślany sposób. Dodatkowo, praca przeglądowa wchodząca w cykl prac przedstawionych przez Doktorantkę stanowi doskonale uzupełnienie informacji dotyczących mechanizmów trzech najbardziej popularnych chorób neurodegeneracyjnych (choroby Alzheimera, Parkinsona i stwardnienia zanikowego bocznego (ALS)), oraz ich współczesnej terapii, włączając także zastosowanie nanocząstek w terapii chorób neurodegeneracyjnych.

W części „Wyniki” mgr Monika Pichla zawarła syntetyczne przedstawienie wyników zaprezentowanych w publikacjach, wchodzących w skład jej rozprawy doktorskiej, które w bardzo dobry sposób streszcza opublikowane przez doktorantkę prace doświadczalne. Forma przedstawienia wyników przez Doktorantkę w formie bezosobowej, mam na myśli stwierdzenia takie jak: „uzyskano”, „wykonano”, „obserwuje się” i np. „wykazano” nie wskazuje bezpośrednio na Doktorantkę, dlatego powtórzę swoją prośbę o szczegółowe zestawienie udziału mgr Moniki Pichli w uzyskaniu wyników wykorzystanych do

przygotowania figur i rycin zamieszczonych w publikacjach wchodzących w skład jej rozprawy doktorskiej. Podsumowanie zawiera usystematyzowane zestawienie najważniejszych wyników/osiągnięć wynikających z przeprowadzonych przez Doktorantkę badań. Można powiedzieć, że wyręczyła w ten sposób recenzenta, sama wymieniając najważniejsze osiągnięcia swojej pracy badawczej. Po wnikliwym zapoznaniu się z załączonymi pracami eksperymentalnymi w pełni zgadzam się z wnioskami przedstawionymi przez Doktorantkę w podsumowaniu jej rozprawy doktorskiej. Mam jednak parę pytań do przedyskutowania podczas obrony. W swoich badaniach Doktorantka wykorzystwała komórki linii SH-SY5Y, które między innymi traktowała 6-hydroksydopaminą. Doktorantka podaje, że toksyczność 6-OHDA przejawia się głównie poprzez uszkodzenie mitochondriów. Jako marker uszkodzenia mitochondriów, Doktorantka w swoich pracach, przyjęła depolaryzację wewnętrznej błony mitochondrialnej, obniżenie masy mitochondrialnej oraz spadek poziomu ATP. Moje pytania są następujące:

1) Jaki może być mechanizm obniżenia masy mitochondrialnej widoczny po jednej godzinie traktowania komórek 6-OHDA?

2) Jaki procent ATP w komórkach linii SH-SY5Y pochodzi z mitochondrialnego łańcucha oddechowego, a jaki ma pochodzenie glikolityczne.

3) Czy spadek wewnątrzkomórkowego poziomu ATP może być z całą pewnością wiązany wyłącznie z uszkodzeniem mitochondriów? Przedstawione dane po 24 godzinach traktowania komórek wskazują na spadek poziomu ATP o około 40%, a masa mitochondriów spadła do 50%. Spadek poziomu ATP można by więc tłumaczyć obniżeniem masy mitochondrialnej. Co z pozostałymi mitochondriami? Czy są funkcjonalne? Z drugiej strony, traktowanie komórek 150 μ M NRNP1 powoduje zwiększenie się masy mitochondrialnej do z 50% do 80% wartości wyjściowej. Poziom ATP wzrasta o 20% - czyli też do 80% wartości wyjściowej. Natomiast pomiar potencjału na wewnętrznej błonie mitochondrialnej wskazuje, że mitochondria nadal są w znaczącej mierze rozprężone. Co zatem odpowiada za wzrost poziomu ATP?

4) Czy można mówić o protekcyjnym działaniu NRNP1? Mimo że podnosi on masę mitochondrialną, to mitochondria nadal wydają się być mało funkcjonalne, a poziom reaktywnych form tlenu jest nawet wyższy niż w przypadku traktowania samą 6-hydroksydopaminą?

5) Biorąc pod uwagę fakt, że Doktorantka nie wybrała klasycznej formy rozprawy doktorskiej i nie miała możliwości przedstawienia innych wyników poza tymi, które znalazły się w zaprezentowanym cyklu prac chciałem zapytać, czy Doktorantka w jakiś sposób potwierdziła funkcjonalność mitochondriów w badanym przez siebie modelu

doświadczalnym? Chodzi mi o sposób bardziej bezpośredni, np. poprzez pomiar zużycia tlenu przez komórki itp. Co w takim razie odpowiada za niezmienną praktycznie „żywołność” komórek (*viability*) traktowanych jednocześnie 6-hydroksydopaminą i 150 μM NRNP1, kiedy mitochondria nadal wydają się być niefunkcjonalne (rozprężone). Chętnie bym poznał opinię Doktorantki na ten temat.

6) Innym nurtującym mnie zagadnieniem, jest różnica, jaką zauważyłem, pomiędzy prezentowanymi przez Doktorantkę wynikami dotyczącymi wpływu 100 μM NRNP1 na komórki traktowane 6-hydroksydopaminą. W wyniki opublikowane w *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* (Fig. 6) wskazują, że 100 μM NRNP1 (bardzo podobnie do omawianego przeze mnie powyżej większego stężenia), także wykazuje dużą właściwość protekcyjną („żywołność” (*viability*)) w przypadku traktowania komórek linii SH-SY5Y 6-hydroksydopaminą. Natomiast w wyniki przedstawione w pracy opublikowanej przez Doktorantkę w czasopiśmie *Molecules* (Fig. 3) wydają się wskazywać na brak właściwości protekcyjnych 100 μM NRNP1 zarówno w pH 7.4 jak i 6.5. Na czym polegają różnice pomiędzy modelem doświadczalnym zaprezentowanym w tych dwóch pracach, które mogą powodować, że 100 μM NRNP1 w raz ma właściwości ochronne, a innym razem ich nie ma. Zdaję sobie sprawę, że w przypadku drugiej pracy wykorzystano NRNP1^{pH} wrażliwe na pH. Jakie było pH podczas inkubacji z NRNP1 w pracy w *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*? Czy wpływ NRNP1 na komórki w obu tych pracach może być porównywany? W jakim pH 100 μM NRNP1 i 100 μM NRNP1^{pH} będzie miało podobny efekt na komórki linii SH-SY5Y traktowanych 6-hydroksydopaminą? Tu byłbym także wdzięczny Doktorantce za wyjaśnienia i dyskusję w kontekście wykorzystania w tych pracach różnych stężeń 6-hydroksydopaminy.

7) Ostatnim pytaniem jakie mam jest to, czy Doktorantka badała oksydacyjne uszkodzenia białek, lipidów czy DNA w kontekście stosowanych przez siebie substancji o charakterze antyoksydantów. Jeżeli tak, to czy chroniły one przed skutkami stresu oksydacyjnego (uszkodzenia, białek, lipidów i DNA) wywoływanymi przez 6-hydroksydopaminę.

Badania przedstawione w pracy doktorskiej wykonano we współpracy z Katedrą Biofizyki Molekularnej Uniwersytetu Łódzkiego; Pracownią Regulacji Transkrypcyjnej Instytutu Biologii Medycznej PAN oraz z Centrum Dydaktyczno-Naukowym Mikroelektroniki i Nanotechnologii Uniwersytetu Rzeszowskiego. Badania te były finansowane z Projekt Narodowego Centrum Nauki SONATA BIS „Antyoksydanty nanocząsteczkowe: biologiczne podstawy potencjalnej terapii celowanej chorób

neurodegeneracyjnych.” numer grantu: NCN 2016/22/E/NZ7/00641, którego kierownikiem była promotor, prof. dr hab. Izabela Sadowska-Bartosz.

Muszę także nadmienić, że mgr Monika Pichla w 2020 roku odbyła czteromiesięczny staż w Department of Cellular and Molecular Medicine, Katholieke Universiteit Leuven w ramach programu Erasmus+. Dodatkowo, czego nie mogę pominąć w recenzji, jest fakt, że dorobek naukowy mgr Moniki Pichli nie ogranicza się tylko do przedstawionych w rozprawie doktorskiej prac, ale składają się na niego także cztery inne opublikowane prace, gdzie Doktorantka nie jest już autorem wiodącym, ale ich tematyka także dotyczy stresu oksydacyjnego. Tak więc sumaryczna wartość współczynnika Impact Factor jej dorobku publikacyjnego łącznie z publikacjami wchodzącymi w skład jej rozprawy doktorskiej (wg daty opublikowania) wynosi 34.148 (880 punktów MNiSW). Doktorantka kilkakrotnie prezentowała wyniki swoich badań w formie komunikatów zjazdowych (jest pierwszym autorem doniesień zjazdowych), jednakże na podstawie tytułów tych doniesień wydaje się, że związane są one z poboczną aktywnością naukową Doktorantki nie związaną z głównym nurtem badań przedstawionych w rozprawie doktorskiej.

Podsumowując, przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska przedstawia nowe odkrycia badawcze. Uważam, że wnioski wyciągnięte z przeprowadzonych badań zostały przez Autorkę właściwie uzasadnione. Dodatkowo, wyniki otrzymane przez Doktorantkę zostały opublikowane w czasopismach naukowych o międzynarodowym zasięgu. Dlatego też, stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji praca doktorska mgr Moniki Pichli w pełni spełnia wymagania formalne stawiane rozprawom doktorskim na podstawie art. 14 ust. 2 pkt 2 - Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2003, Nr 65, poz 595 z późn. zm.) i wnoszę do Rady Naukowej Kolegium Nauk Przyrodniczych Uniwersytetu Rzeszowskiego o dopuszczenie pani mgr Moniki Pichli do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie biorąc pod uwagę wysokie walory merytoryczne przedstawionej mi do recenzji rozprawy doktorskiej zgłaszam wniosek do Rady Naukowej Kolegium Nauk Przyrodniczych Uniwersytetu Rzeszowskiego o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr Moniki Pichli.



Mariusz R. Więckowski