

Kraków, 24.04.2015

Dr hab. Małgorzata Malczewska-Malec, prof. nadzw. UJ
Zakład Biochemii Klinicznej
Uniwersytet Jagielloński, Collegium Medicum

Recenzja pracy doktorskiej mgr Karoliny Persona

pt. „Wpływ benzylopipezyny – modelowego związku z grupy dopalaczy na stan energetyczny komórek, apoptozę i stres oksydacyjny”

Napisanej pod kierunkiem:

prof. dr hab. n. med. Wojciecha Piekoszewskiego i

prof. dr hab. med. Aldony Dembińskiej-Kieć.

Rozprawa doktorska mgr. Karoliny Persona została wykonana w ramach projektu „Interdyscyplinarne Studia Doktoranckie – Nauki molekularne dla medycyny (MOL-MED)” współfinansowanego ze środków Unii Europejskiej oraz stypendium Narodowego Centrum Nauki.

Praca jest poświęcona ważnemu i nadal nie w pełni wyjaśnionemu problemowi toksycznego wpływu benzylopipezyny (BZP) na zdrowie człowieka. Pochodne piperazyny są substancjami psychoaktywnymi, które stanowią częsty składnik tzw. „narkotyków zmodyfikowanych”, zwanych popularnie „dopalaczami”. Związki te, pomimo że prawnie zabronione, są stosowane przez różne grupy ludzi, w tym młodzież, ze względu na efekty działania, takie jak poczucie przyjemności, zwiększenie wydolności psychofizycznej czy pobudzenie. Zatrucia „nowymi substancjami psychoaktywnymi” stanowią istotny problem kliniczny, zwłaszcza że dokładny mechanizm ich działania na komórki ludzkie oraz skutki uboczne nie są dobrze poznane. W dostępnym piśmiennictwie obecne są tylko nieliczne prace oceniające biologiczne skutki nowej generacji substancji psychoaktywnych na poziomie

komórkowym czy molekularnym. Tak więc, uważam, że przedłożona do recenzji praca dotyczy istotnego i aktualnego zagadnienia.

Celem badań mgr. Karoliny Persona było określenie wpływu BZP na parametry stresu oksydacyjnego, stan energetyczny i proces apoptozy wybranych typów komórek ludzkich. Do szczegółowych celów pracy należała ocena zmiany potencjału błony mitochondrialnej, zaburzenia biosyntezy ATP i przepływu elektronów w poprzek wewnętrznej błony mitochondrialnej, a także analiza wpływu BZP na powstawanie reaktywnych form tlenu (ROS) i jego skutków w postaci uszkodzenia DNA. Ponadto, doktorantka badała wpływ BZP na proces apoptozy, poprzez ocenę aktywacji wybranych kaspaz i zmian ekspresji genów związanych z tym procesem. Cele pracy zostały przez Doktorantkę trafnie wyznaczone i poprawnie sformułowane.

Badania doktorantki miały charakter eksperymentu *in vitro* i przeprowadzone zostały na 2 ludzkich, nowotworowych liniach komórkowych: glejowych LN-18 i wątrobowych HepG2. Wybór odpowiedniego typu komórek do prowadzonych badań jest bardzo ważny i Doktorantka słusznie wybrała komórki ośrodkowego układu nerwowego, opierając się na danych klinicznych pacjentów stosujących preparaty zawierające BZP, a także w oparciu o dane z literatury wskazujące na sympatykomimetyczne właściwości tych związków. Wybór komórek wątrobowych jest również w pełni uzasadniony, ponieważ wątroba jest kluczowym narządem biorącym udział w procesach detoksyfikacji.

Rozprawa ma typowy układ pracy eksperymentalnej, liczy 183 strony i podzielona jest na 13 głównych rozdziałów. Część teoretyczna obejmuje 3 rozdziały: 1. „Wprowadzenie”, 2. „Charakterystyka benzylopiperazyny” oraz 3. „Apoptoza jako odpowiedź na działanie czynników cytotoksycznych”. We „Wprowadzeniu” (str. 18-21) zawarte są szczegółowe informacje dotyczące przyjętych definicji prawnych określających substancje psychoaktywne i ich nazewnictwo, a także dane o ich rozpowszechnieniu i systemach rejestracji i przepływu informacji w Unii Europejskiej. Zdanie końcowe z rozdziału „Wprowadzenie” (str.21): *„Wnioski płynące z przeprowadzonych i opisanych badań mogą więc przyczynić się do poszerzenia wiedzy na temat bezpośredniego wpływu nowo pojawiających się pochodnych tej substancji na organizm ludzki.”* powinno być raczej umieszczone w rozdziale „Wnioski”. Rozdział 2 (str.22-41): „Charakterystyka benzylopiperazyny” w sposób bardzo wyczerpujący, przedstawia dane dotyczące rozpowszechnianych preparatów zawierających BZP, ich historię, poznane mechanizmy oddziaływania na tkanki, skutki uboczne, toksyczność, a nawet

regulacje prawne. Podobnie, następny rozdział 3 (str. 42-69) o tytule: „Apoptoza jako odpowiedź na działanie czynników cytotoksycznych” w sposób bardzo wnikliwy przedstawia aktualny stan wiedzy, oraz nowe kierunki badawcze dotyczące roli i mechanizmów apoptozy, udziału mitochondriów i stresu siateczki endoplazmatycznej w tym procesie oraz znaczenia wybranych czynników regulacyjnych. Informacje zawarte w części teoretycznej dysertacji świadczą o bardzo dobrym przygotowaniu teoretycznym doktorantki do prowadzenia badań, o jej dużej wiedzy nie tylko z zakresu biochemii ale także biologii komórki.

W części eksperymentalnej, opisana jest bardzo szczegółowo baza doświadczalna oraz metodyka prowadzonych badań (str. 74-108). Autorka rozprawy w swojej pracy stosowała różnorodne, nowoczesne techniki badawcze (hodowle komórkowe, technika bioluminescencji, cytometrii przepływowej FACS, izolacji DNA i inne techniki biologii molekularnej), świadczące o ogromnym wkładzie pracy i dużych umiejętnościach praktycznych. Jednakże, w rozdziale „Metodyka badań” zdaniem recenzenta, Doktorantka niepotrzebnie rozbudowała tekst o informacje teoretyczne, pochodzące z literatury, które należałoby raczej umieścić w dyskusji (przykładowo na str. 94 zamieściła rozważania dotyczące znaczenia 8-hydroksy-2-deoksyguanozyny jako markera uszkodzeń oksydacyjnych DNA komórek).

Wyniki badań, zamieszczone na str.109 – 135 (Podsumowanie wyników na str. 136 – 137) są opisane precyzyjnie, zwięźle i poprawnie graficznie przedstawione. W pierwszej części rozdziału przedstawione są wyniki cyklu badań prowadzonych na liniach komórek LN-18, a w drugiej części zaprezentowano wyniki analogicznych badań dla linii komórek HepG2.

W rozdziale 10: „Omówienie wyników i dyskusja” (str. 138 – 149) Autorka uzasadnia celowość podjętych badań i porównuje uzyskane przez siebie wyniki z danymi z literatury. Wywód przeprowadzony jest w sposób logiczny i ciekawy. Nie w pełni satysfakcjonujące pozostaje jednak wyjaśnienie możliwych przyczyn rozbieżnych wyników w zmianie potencjału wewnętrznej błony mitochondrialnej po BZP w 2 różnych liniach komórkowych. W komórkach linii LN-18 zaobserwowano wzrost potencjału błony mitochondrialnej pod wpływem stężenia 300 $\mu\text{g/mL}$ BZP, przy jednoczesnym spadku produkcji wewnątrzkomórkowego ATP i nasilonej produkcji reaktywnych form tlenu (ROS). W komórkach linii HepG2 również odnotowano spadek ATP i nasilenie produkcji ROS, natomiast potencjał błony mitochondrialnej obniżył się po BZP w dawce 100 i 300 $\mu\text{g/mL}$. Wyjaśnienie przyczyn tych rozbieżności pozostawia pewien niedosyt. Nie umniejsza to

jednak wartości przeprowadzonej przez Doktorantkę dyskusji, która jest wyczerpująca i podparta istotnymi pozycjami z piśmiennictwa międzynarodowego i polskiego.

W rozdziale 11 rozprawy doktorskiej (str. 150 – 152) Autorka formułuje wnioski z przeprowadzonego eksperymentu badawczego. Przedstawione wnioski wynikają z przeprowadzonych badań i odpowiadają na postawione problemy badawcze. Niemniej jednak, zdaniem recenzenta, rozdział byłby bardziej przejrzysty gdyby Autorka ujęła wnioski w punkty i zrezygnowała z dodatkowej dyskusji w tym rozdziale. Zastrzeżenia budzi też tekst zawarty w tym rozdziale: „*W rozwoju patomechanizmu choroby Alzheimer'a wymieniany jest natomiast stres siateczki endoplazmatycznej (Nakagawa et al., 2000), którego aktywację pod wpływem najwyższego stężenia BZP zaobserwowano w linii LN-18. Na tej podstawie można przypuszczać iż osoby przyjmujące BZP mogą być bardziej narażone na zachorowanie na tego typu schorzenia, a dopalacz ten może przyspieszać rozwój chorób związanych z zaburzeniami funkcji mitochondriów i stresem siateczki endoplazmatycznej.*” Autorka nie jest uprawniona do wyciągnięcia tak daleko idącego wniosku, ponieważ takich badań nie przeprowadzała i należało raczej tego typu dywagacje umieścić w dyskusji.

Streszczenie pracy (str. 153 – 156) jest napisane zwięźle i wyczerpująco, zarówno w języku polskim jak i angielskim.

Piśmiennictwo (str. 157 – 178) obejmuje 286 pozycji z literatury anglojęzycznej i polskiej. Wśród cytowanych pozycji jest też oryginalna anglojęzyczna publikacja Doktorantki (pierwszy autor), związana tematycznie z dysertacją doktorską. Na stronach 178 - 179 zamieszczone są też dodatkowo 4 ustawy i 9 raportów dotyczących prawnych regulacji odnoszących się do związków psychoaktywnych, co dodatkowo świadczy o dużej rzetelności i pedanterii Doktorantki.

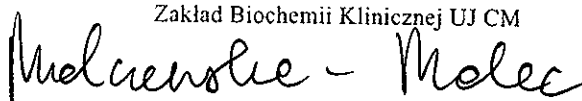
Praca zawiera też precyzyjnie sporządzone „Zestawienie stosowanych skrótów” i ich wyjaśnienie podane jest zarówno w języku polskim jak i angielskim. Dodatkowo praca zawiera, umieszczony na końcu spis 6 tabel i 37 rycin.

Proporcje pomiędzy poszczególnymi częściami rozprawy są prawidłowe a rozdziały poprawnie zredagowane. Drobne stylistyczne uchybienia w niczym nie umniejszają wysokiej wartości tej pracy. Zwraca uwagę bardzo estetyczna i dopracowana w szczegółach edycja przedstawionej rozprawy doktorskiej.

Opisane przez Doktorantkę badania w istotny sposób poszerzają naszą wiedzę dotyczącą wpływu benzylopipezyny na stan energetyczny, apoptozę i stres oksydacyjny ludzkich komórek. Niniejsza dysertacja stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, ma duże walory poznawcze i jest również istotna dla medycyny klinicznej. Precyzyjne poznanie mechanizmów oddziaływania benzylopipezyny na tkanki ludzkie stanowi bazę do opracowania skutecznych terapii zatruc tymi związkami. Praca prezentuje wysoki poziom merytoryczny, wykazuje dużą ogólną wiedzę Doktorantki oraz umiejętność samodzielnego planowania i prowadzenia pracy naukowej.

Rozprawa doktorska magister Karoliny Persona o tytule: „Wpływ benzylopipezyny – modelowego związku z grupy dopalaczy na stan energetyczny komórek, apoptozę i stres oksydacyjny” spełnia bez zastrzeżeń warunki określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki.

W związku z powyższym mam zaszczyt przedstawić Wysokiej Radzie Wydziału Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego wniosek o dopuszczenie magister Karoliny Persona do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Bardzo wysokie walory merytoryczne przedstawionej dysertacji upoważniają mnie do wystąpienia o jej wyróżnienie.

Zakład Biochemii Klinicznej UJ CM

dr hab. Małgorzata Malczewska-Malec, profesor UJ
Kierownik