



Dr hab. Hanna Pruchnik, profesor UPWr

Wrocław, 13.12.2020 r.

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Joanny Strumiłło, pt.
„Wpływ melatoniny i resweratrolu na zmiany struktury i funkcji dehydrogenazy
aldehydu 3-fosfoglicerynowego i dehydrogenazy mleczanowej indukowane
reaktywnymi formami tlenu i azotu”**

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska dotyczy aktualnych i ważnych zagadnień związanych z poszukiwaniem skutecznych metod zapobiegania i leczenia chorób neurodegeneracyjnych. Z uwagi na proces starzenia się społeczeństw, znacząco wzrasta liczba zdiagnozowanych przypadków zachorowań na stwardnienie zanikowo boczne czy choroby Alzheimera i Parkinsona. Badania naukowe wykazują, że jedną z przyczyn lub konsekwencji powstania tych nieuleczalnych jak dotąd chorób, jest stres oksydacyjny. Skutkiem długotrwałego lub wysokiego stresu są najczęściej uszkodzenia ważnych molekuł komórkowych takich jak lipidy, DNA czy białka. Zatem wybór tematu badawczego jest jak najbardziej zasadny i trafny.

Praca doktorska mgr Joanny Strumiłło została wykonana w Katedrze Biofizyki Molekularnej Instytutu Biofizyki na Wydziale Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego pod kierunkiem prof. dr hab. Mieczysława Puchały i dr hab. Aleksandry Rodackiej (promotor pomocniczy). Środki finansowe na badania, prowadzone w ramach niniejszej rozprawy, pochodziły z dotacji celowej dla młodych naukowców (Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego, 2015-2016) oraz z projektu NCN Opus nr 2012/05/B/NZ1/00701.



Układ rozprawy jest przejrzysty, dysertacja została podzielona na 11 rozdziałów i starannie zredagowana. Autorka we wprowadzeniu teoretycznym, w oparciu o odpowiednią literaturę, uzasadnia znaczenie i celowość podjętych badań. Następnie przedstawia cel pracy, główne założenia i zastosowane metody badawcze oraz dyskusję najważniejszych wyników, podsumowanie i wnioski. Kolejne rozdziały stanowią streszczenia w języku polskim i angielskim, literatura, łącznie 62 pozycje, z czego około 60% są to prace z ostatnich pięciu lat, pozostały dorobek naukowy Autorki oraz kopie publikacji tworzących pracę doktorską i oświadczenia współautorów tych prac.

Podstawą rozprawy doktorskiej są trzy oryginalne, spójne tematycznie prace z lat 2015-2019, opublikowane w czasopismach z listy JCR o sumarycznym współczynniku oddziaływania $IF=9,236$ (liczba punktów MNiSW - 135).

1. A. Rodacka, J. Strumillo, M. Puchala, E. Serafin, G. Bartosz (2019) Comparison of protective properties of resveratrol and melatonin in the radiation inactivation and destruction of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and lactate dehydrogenase. *International Journal of Radiation Biology* 95(11), 1472-1483.
2. J. Strumillo, K.E. Nowak, A. Krokosz, A. Rodacka, M. Puchala, G. Bartosz (2018) The role of resveratrol and melatonin in the nitric oxide and its oxidation products mediated functional and structural modifications of two glycolytic enzymes: GAPDH and LDH. *BBA - General Subjects* 1862, 877–885.
3. A. Rodacka, J. Strumillo, E. Serafin, M. Puchala (2015) Analysis of Potential Binding Sites of 3,5,4'-Trihydroxystilbene (Resveratrol) and trans-3,3',5,5'-Tetrahydroxy-4'-methoxystilbene (THMS) to the GAPDH Molecule Using a Computational Ligand-Docking Method: Structural and Functional Changes in GAPDH Induced by the Examined Polyphenols. *Phys. Chem. B.* 119, 9592–9600.



Zgodnie z oświadczeniami wszystkich współautorów, udział procentowy Doktorantki w poszczególnych pracach jest znaczący. W publikacji zamieszczonej w BBA (2), mgr Joanna Strumiłło jest pierwszym autorem i autorem korespondencyjnym, a jej wkład w powstanie manuskryptu wynosi 55%, natomiast w pozostałych po 40% (1 i 3). Doktorantka napisała pierwotną wersję artykułu z BBA i uczestniczyła w pisaniu/korekcie pozostałych manuskryptów, a także zaprojektowała część eksperymentów omówionych w drugiej i trzeciej pracy. W każdej publikacji Autorka rozprawy wykonała część badań i opracowała uzyskane wyniki, co pozwala stwierdzić, że Doktorantka aktywnie uczestniczyła w badaniach zarówno na etapie ich planowania, wykonania i opracowania danych w formie publikacji. Wszystko to świadczy o umiejętności samodzielnego prowadzenia pracy naukowej.

Warto również zaznaczyć, że mgr Joanna Strumiłło oprócz publikacji włączonych do rozprawy doktorskiej jest współautorką 4 prac oryginalnych, rozdziału w monografii i 15 komunikatów zjazdowych, na uwagę zasługuje wysoka całkowita wartość *impact factor* dorobku naukowego Doktorantki, IF=65,452 (280 punktów MNiSW).

Celem pracy Doktorantki było określenie roli melatoniny i resweratrolu w oksydacyjnych uszkodzeniach dehydrogenazy aldehydu 3-fosfoglicerynowego (GAPDH) i dehydrogenazy mleczanowej (LDH).

Do badań wybrano dwa, naturalnie występujące przeciwutleniacze, melatoninę i resweratrol. Pracę podzielono na kilka etapów. Wykonano badania, których celem było porównanie wpływu wolnych rodników tlenu (RFT) oraz azotu (RFA) na zmiany aktywności i struktury wybranych białek. Do testów oprócz GAPDH wybrano LDH, obie dehydrogenazy pochodzące z mięśni królika: GAPDH - wielofunkcyjny enzym glikolityczny stosowany w analizie mechanizmu chorób neurodegeneracyjnych natomiast LDH, enzym o podobnej strukturze i funkcji, co GAPDH, ale znacząco różnej budowie centrum aktywnego. Co bardzo istotne, dobór odpowiednich obiektów badawczych umożliwił lepsze zrozumienie zmian strukturalnych i funkcjonalnych w oksydacyjnie zmienionym GAPDH. Kolejnym etapem badań było sprawdzenie efektywności wybranych przeciwutleniaczy w zapobieganiu oksydacyjnym modyfikacjom i uszkodzeniom GAPDH oraz LDH. Ponadto, w celu wyjaśnienia przyczyny tego



efektu, oceniono możliwość oddziaływania melatoniny i resweratrolu z cząsteczkami badanych białek.

Ogólny cel pracy został prawidłowo sformułowany, a jego realizacja wymagała przeprowadzenia obszernych badań, które wykonano przy użyciu odpowiednio dobranych metod i technik badawczych: spektroskopii fluorescencyjnej, UV-Vis oraz dichroizmu kołowego, wysokosprawnej chromatografii ciekowej (HPLC), pomiarów potencjału zeta (ζ) oraz metody modelowania molekularnego.

Reaktywne formy tlenu i azotu były generowane metodami: radiacyjną, w wyniku radiolizy wody, enzymatyczną i chemiczną. Zmiany konformacyjne GAPDH i LDH w obecności RFT lub RFA określono metodą dichroizmu kołowego i HPLC. Przy użyciu metody spektrofotometrycznej oszacowano zmiany funkcjonalne w białkach na podstawie ich zdolności do redukcji lub utleniania NAD(H), jako kofaktora w katalizowanych przez te enzymy reakcjach, natomiast oksydacyjne modyfikacje reszt cysteiny określono metodą spektrometryczną (Ellmana). Powyżej wymienione metody posłużyły również do oceny efektywności melatoniny i resweratrolu w zapobieganiu oksydacyjnym zmianom badanych białek. Do badania oddziaływań przeciwutleniacz-białko wykorzystano metodę modelowania molekularnego. W przypadku GAPDH i resweratrolu zweryfikowano rezultaty obliczeń na drodze doświadczalnej, zbadano gaszenie fluorescencji reszt tryptofanu i czas życia fluorescencji tryptofanu. Dodatkowo zmierzono zmiany potencjału ζ na powierzchni GAPDH bez i w obecności przeciwutleniacza.

Na uznanie zasługuje zamieszczona w dysertacji obszerna dyskusja i omówienie wyników zawartych w publikacjach (niezależnie od załączonych publikacji). W poszczególnych podpunktach rozdziału „Dyskusja najważniejszych wyników” Doktorantka zestawia i porównuje wyniki otrzymane różnymi metodami, odnosi się do poszczególnych publikacji i odwołuje do rysunków i tabel tam zamieszczonych. Co bardzo istotne, Autorka umiejętnie porównuje wyniki badań własnych z wynikami uzyskanymi przez innych badaczy cytując odpowiednie i aktualne publikacje, na podstawie których formułuje wnioski. Świadczy to o dużej wiedzy teoretycznej mgr Joanny Strumiłło w odniesieniu do swoich badań, a tym samym w obszarze swojej dyscypliny.



Podczas lektury publikacji i zamieszczonej dyskusji nasunęły mi się pytania/uwagi do Doktorantki. W jakiej temperaturze były prowadzone pomiary metodą dichroizmu kołowego i HPLC w badaniach, których celem było określenie ochronnych właściwości melatoniny i resweratrolu (publikacja nr 1)? Autorka dysertacji możliwość występowania oddziaływań polifenol-białko weryfikowała również metodami biofizycznymi, m.in. metodą gaszenia fluorescencji. Pomiary były prowadzone w temperaturze pokojowej, czy Doktorantka wykonywała pomiary w temperaturze 37°C (fizjologicznej)? Autorka na podstawie nieliniowego przebiegu krzywej Sterna-Volmera sugeruje mechanizm dynamiczny jak i statyczny gaszenia fluorescencji tryptofanu. Weryfikacją i potwierdzeniem tej sugestii są w tym przypadku wyniki dodatkowych eksperymentów, pomiarów czasów życia fluorescencji, potencjału ζ oraz modelowania molekularnego. Mam jedynie wskazanie, co do ewentualnych następnych testów, pomiary gaszenia fluorescencji Doktorantka powinna wykonać w kilku temperaturach, to umożliwi określenie mechanizmu gaszenia fluorescencji, można też wyznaczyć k_q (stałą szybkości gaszenia bimolekularnego), co pozwoli oszacować dodatkowo stopień ekspozycji fragmentów białka zawierającego reszty tryptofanowe.

Autorka w podsumowaniu stwierdziła, że „zarówno resweratrol jak i melatonina mogą nasilać lub przeciwdziałać oksydacyjnym uszkodzeniom w badanych enzymach glikolitycznych”, co oczywiście zależy od rodzaju RFT lub RFA w badanym układzie. Czy otrzymane wyniki możemy odnieść do organizmów żywych? Czy możemy określić „bezpieczne” stężenie przeciwutleniaczy? Czy można zaplanować badania *in vivo*? Bardzo proszę o komentarz.

Rozprawę kończą wnioski i podsumowanie, których treść pozwala stwierdzić, że cel pracy został osiągnięty. Uzyskane wyniki potwierdziły znacznie większą wrażliwość GAPDH na indukowane przez RFT i RFA zmiany funkcjonalne i strukturalne w porównaniu z LDH, co jak wykazano, jest związane z różnicą w budowie obu enzymów. Wykazano, że melatonina i resweratrol mają działanie zarówno pro- jak i antyoksydacyjne względem białek GAPDH i LDH, który jest ściśle związany z obecnością określonego rodzaju rodnika w układzie badawczym. W czasie reakcji RFT i RFA z przeciwutleniaczami powstają rodniki lub produkty utleniania resweratrolu i melatoniny, które istotnie wpływają na funkcję i strukturę GAPDH oraz w dużo mniejszym stopniu na cząsteczkę LDH. Właściwości prooksydacyjne badanych



przeciwutleniaczy przeważały w układach, gdzie generowane były mniej reaktywne, ale bardziej selektywne RFT i RFA. Wyraźny efekt antyoksydacyjny badanych związków zaobserwowano jedynie w przypadku, gdy RFT były generowane radiacyjnie, z tym, że resweratrol zapobiegał zmianom funkcjonalnym obu enzymów, melatonina zapobiegała zmianom strukturalnym GAPDH i LDH, a przed zmianami funkcjonalnymi chroniła tylko cząsteczkę LDH. Metodami biofizycznymi i modelowania molekularnego potwierdzono również, że pomiędzy wybranymi do badań przeciwutleniaczami a enzymami zachodzą oddziaływania niekowalencyjne.

Podsumowując, należy podkreślić, że mgr Joanna Strumiłło podjęła się realizacji ważnego zagadnienia, badania zostały starannie zaplanowane i opublikowane w renomowanych czasopismach. Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska zawiera istotne elementy poznawcze, uzyskane wyniki dostarczyły cennych informacji na temat interakcji resweratrolu i melatoniny oraz ich produktów utleniania z dehydrogenazą aldehydu 3-fosfoglicerynowego i dehydrogenazą mleczanową. Wiedza na temat tych oddziaływań ma duże znaczenie w kontekście poszukiwania skutecznych substancji w zapobieganiu/leczeniu zaburzeń neurodegeneracyjnych.

Uważam, że przedstawiona do oceny przez mgr Joannę Strumiłło rozprawa jest oryginalnym osiągnięciem i odpowiada wymogom stawianym pracom doktorskim zgodnie z Ustawą z dnia 14.03.2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule naukowym w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595, z późniejszymi zmianami). W związku z powyższym wnoszę do Komisji Uniwersytetu Łódzkiego ds. Stopni Naukowych w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie mgr Joanny Strumiłło do kolejnych etapów przewodu doktorskiego.

Wrocław, 13 grudnia 2020

dr hab. Hanna Pruchnik
Hanna Pruchnik