



Prof. Joanna Szczepanowska
Instytut Biologii Doświadczalnej
im. M. Nenckiego, PAN

Warszawa, 8 październik 2022

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr. Karoliny Dominiak

pt. „Powiązanie produkcji reaktywnych form tlenu za stopniem redukcji koenzymu Q w mitochondriach” wykonanej pod kierunkiem prof. dr hab. Wiesławy Jarmuszkiewicz z Wydziału Biologii, Instytutu Biologii Molekularnej i Biotechnologii, Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu

Mitochondria pełnią w komórce szereg kluczowych funkcji, odgrywają istotną rolę procesach metabolicznych. Główną funkcją mitochondriów jest generowanie energii, magazynowanej w postaci ATP. ATP powstaje na drodze fosforylacji oksydacyjnej, szeregu reakcji, zachodzących dzięki aktywności pięciu kompleksów białkowych łańcucha przenośników elektronów oraz syntazy ATP, zlokalizowanych w wewnętrznej błonie mitochondrialnej. Część elektronów biorących udział w procesie fosforylacji oksydacyjnej wymyka się z łańcucha oddechowego i może oddziaływać z cząsteczkami tlenu, tworząc reaktywne formy tlenu (RTF). Mitochondrialny koenzym Q jest nośnikiem elektronów łańcucha oddechowego, przeciwutleniaczem ale także może uczestniczyć w produkcji RTF. Niewielkie ilości RTF są istotne dla komórki, bo są zaangażowane w przekazywaniu sygnału, natomiast nadmiar RTF wywołuje stres oksydacyjny w komórce. Właściwe funkcjonowanie mitochondriów jest szczególnie istotne dla komórek o wysokim zapotrzebowaniu energetycznym.

Autorka pracy doktorskiej skupiła się na rozwiązaniu bardzo istotnej roli koenzymu Q w mitochondriach badając powiązanie produkcji reaktywnych form tlenu ze stopniem redukcji mitochondrialnego koenzymu Q.

Należy podkreślić, że podjęta przez Doktorantkę tematyka jest wysoce uzasadniona ponieważ rośnie zainteresowanie zastosowaniem koenzymu Q w terapiach wielu chorób, szczególnie tych



spowodowanych dysfunkcją mitochondriów (tzw. choroby mitochondrialne) oraz chorób neurodegeneracyjnych czy sercowo-naczyniowych. Zatem problematyka przedstawiona w rozprawie doktorskiej bardzo trafnie wpisuje się w nurt badań a wybór tematyki badawczej uważam za słuszny, niezwykle ważny, ale też i niezwykle trudny koncepcyjnie i metodycznie do rozwikłania.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska jest oparta na czterech spójnych tematycznie publikacjach, które ukazały się w latach 2018-2022 (wg chronologii zamieszczania ich w rozprawie):

1. Dominiak K, Koziel A, Jarmuszkiewicz W (2018) The interplay between mitochondrial reactive oxygen species formation and the coenzyme Q reduction level. *Redox Biology* 18, 256-265. (IF 12,038)

2. Jarmuszkiewicz W, Dominiak K, Galganski L, Galganska H, Kicinska A, Majerczak J, Zoladz JA (2020) Lung mitochondria adaptation to endurance training in rats. *Free Radical Biology Medicine* 161, 163-174. (IF 7,934)

3. Dominiak K, Jarmuszkiewicz W (2021) The relationship between mitochondrial reactive oxygen species production and mitochondrial energetics in rat tissues with different contents of reduced coenzyme Q. *Antioxidants*, 10, 533. (IF 6,649)

4. Dominak K, Galganski L, Budzinska A, Woyda-Ploszczyca A, Zoladz JA, Jarmuszkiewicz W (2022) Effects of endurance training on the coenzyme Q redox state in rat heart, liver and brain at the tissue and mitochondrial levels: implications for reactive oxygen species formation and respiratory chain remodeling. *International Journal of Molecular Sciences* 23 (2), 896. (IF 6,132)

Wymienione artykuły naukowe zostały opublikowane w renomowanych, międzynarodowych czasopismach indeksowanych w bazie JCR; czasopisma te charakteryzują się bardzo wysokim współczynnikiem wpływu Impact Factor (IF), który łącznie dla tych prac wynosi 32,753. Dlatego szczególnie należy podkreślić, niezwykle ważną wagę opublikowanych wyników. Wszystkie te publikacje, są pracami zespołowymi. Jednakże dwie publikacje (nr 1 i 3), które stanowią trzon tej rozprawy to publikacje 2-3 autorskie. W trzech publikacjach (nr 1, 3 i 4) Doktorantka jest pierwszym autorem. Mimo, że w oświadczeniach współautorów brakuje przybliżonego ilościowego (procentowego szacunku) udziału Doktorantki, to jednak na podstawie opisu udziału w badaniach, na podstawie konkretnych



metod biochemicznych wykonywanych przez Doktorantkę mogłam ocenić jej zaangażowanie w powstanie tych publikacji. Mianowicie Doktorantka:

1. uczestniczyła w przygotowaniu koncepcji badań
2. izolowała mitochondria
3. przeprowadzała pomiary zużycia tlenu, potencjału błonowego, ilości i poziomu redukcji koenzymu Q, produkcji H_2O_2 , aktywności oksydazy cytochromu c
4. analizowała dane i pomagała w przygotowaniu manuskryptu

Na tej podstawie wydedukowałam, że Jej udział w powstaniu tych publikacji był wiodący. Ponadto badania prowadzone przez doktorantkę wykonano w ramach dwóch projektów finansowanych przez Narodowe Centrum Nauki: grantu OPUS (2016-2021) kierowanego przez prof. Wiesławę Jarmuszkiewicz - promotora pracy oraz grantu PRELUDIUM (2019-2023).

Ocena układu rozprawy doktorskiej i formalnej strony

Układ przedłożonej rozprawy doktorskiej jest zgodny z normami przyjętymi dla tego typu opracowań, jest przejrzysty i poprawny.

Recenzowana rozprawa doktorska składa się z sześciu rozdziałów: (1, 2) streszczenia w języku polskim i angielskim, (3) cykl publikacji wchodzących w skład rozprawy, (4) wprowadzenie i cele pracy, (5) podsumowanie wyników (6) wnioski, (7, 8) oświadczenia autora rozprawy doktorskiej oraz współautorów, (9) wykaz pozostałych publikacji autora rozprawy doktorskiej i (10) kopie publikacji autora rozprawy doktorskiej.

W rozdziale „**Streszczenie**” Autorka jasno przedstawiła cele pracy doktorskiej, najważniejsze osiągnięcia naukowe opublikowane we wszystkich czterech publikacjach oraz znaczenie tych badań. W kolejnym rozdziale „**Wprowadzenie i cele pracy**” Doktorantka w dość skromny sposób wprowadza czytelnika w tematykę badań. Brakuje chociaż krótkiego opisu funkcjonowania mitochondriów w komórce i choćby schematycznego przedstawienia łańcucha oddechowego i ATPazy z miejscem działania koenzymu Q w błonie mitochondrialnej. Mimo, że to tak niewiele, ale byłby to punkt odniesienia i kompaktowe wprowadzenie do badań prezentowanych w dalszej części pracy, co więcej stanowiłoby doskonałe wytłumaczenie podjętej tematyki badawczej. Szkoda, bo jest pierwszym autorem świetnej przeglądownki o tytule „Różne oblicza mitochondrialnego koenzymu Q”, w której zamieszczone są wszystkie te informacje.



Cel pracy został postawiony jasno i dobrze sformułowany, czyli „zbadanie powiązania produkcji RTF ze stopniem redukcji koenzymu Q w mitochondriach w warunkach fosforylujących (podczas syntezy ATP) i niefosforylujących (braku syntezy ATP)”. Aby osiągnąć zamierzony cel Autorka podjęła się wykonania czterech zadań badawczych realizowanych przy zastosowaniu następujących modeli badawczych (organizmów, tkanek), z których izolowała mitochondria: *Acanthamoeba castellanii*, tkanka płucna, serce, mózg i wątroba szczura.

Kolejny rozdział to „**Podsumowanie wyników**”. W pierwszej pracy (**nr 1** *Redox Biology* 18, 2018), w wyizolowanych mitochondriach *A. castellanii* badano powiązania pomiędzy szybkością produkcji H_2O_2 a poziomem redukcji mitochondrialnego koenzymu Q (mQ). Po raz pierwszy przeprowadzona analiza kinetyczna zależności tworzenia mitochondrialnych RTF od poziomu redukcji endogennej mQ pokazała, że produkcja mRTF jest bezpośrednią funkcją poziomu redukcji mQ a nie potencjału wewnętrznej błony mitochondrialnej. Wykonanie pomiarów przy zastosowaniu wyrafinowanych metod oraz sama koncepcja badań tej pracy są imponujące. Należy podkreślić, że ten cały warsztat pracy to odzwierciedlenie ekspertyzy Promotora prof. Wiesławy Jarmuszkiewicz, która od wielu lat zajmuje się metabolizmem tlenowym komórki, a jej badania są znane i cenione w świecie nauki. Druga praca w cyklu publikacji (**nr 2** *Free Rad. Biol. Med.* 161, 2020), to zbadanie metabolizmu tlenowego, aktywności oddechowej i ilości koenzymu w tkance płucnej szczura po 8-tygodniowym treningu wytrzymałościowym. I tutaj rolę Doktorantki była ocena poziomu i korelacji koenzymu Q i mRTF, w homogenatach tkankowych i w wyizolowanych mitochondriach. W pracy trzeciej (**nr 3** *Antioxidants*, 10 2021) porównywano poziom wytwarzania mRTF w homogenatach tkankowych i w mitochondriach różnych tkanek szczura, tych o dużej zawartości koenzymu Q (jak serce i wątroba) oraz z tkanek o małej zawartości koenzymu Q (jak mózg i płuca). Przy pomocy tych samych metod jak w poprzednich pracach, ale za to po raz pierwszy badano produkcję mRTF w warunkach niefosforylujących przechodzących do warunków fosforylujących w mitochondriach. W ostatniej czwartej publikacji (**nr 4** *IJMS* 23, 2022) celem było pokazanie jaki wpływ ma 8-tygodniowy trening, na zawartość koenzymu Q i produkcję RTF w homogenatach tkankowych i mitochondriach pochodzących z tkanek o dużym zapotrzebowaniu energetycznym.

Sekwencja przedstawionych prac świadczy o rozwoju naukowym Pani Karoliny Dominiak i dążeniu do rozwiązania konkretnego problemu badawczego. Opis przedłożonych do doktoratu publikacji jest poprawny, chociaż miejscami mało precyzyjny, co wynika być może z bezpośredniego tłumaczenia z

języka angielskiego (co czasami ma odzwierciedlenie w nieco udziwnionych stylistycznie sformułowaniach z zastosowaniem zbyt dużych skrótów myślowych np. „w mitochondriach płuc szczura”, a powinno być „w mitochondriach wyizolowanych z płuc szczura”). Dla przykładu zacytuję zdanie ze strony 11, drugi akapit od dołu strony „...trening wytrzymałościowy zwiększa systemy antyoksydacyjne (ilość Q9 i Q10 oraz poziom dysmutazy ponadtlenkowej, SOD) na poziomie tkanki płucnej...”. Jest to dość niefortunne sformułowanie i mało precyzyjne, bo przecież doktorantka oprócz poziomu SOD1 i SOD2 nie badała innych enzymów antyoksydacyjnych (np. glutationowej peroksydazy czy katalazy) oraz innych nieenzymatycznych antyoksydantów w homogenacie tkankowym.

Reasumując, każda z publikacji wchodzących w skład doktoratu jest omówiona w następujący sposób: najpierw przedstawiony jest cel badań opisanych w publikacji i podane są rezultaty tych badań. Taki sposób prezentacji osiągniętych wyników pozwala poznać całościowe rozwiązanie postawionego problemu badawczego powstałe w wyniku pracy wszystkich współautorów publikacji. Brakuje jednak precyzyjnego omówienia udziału Doktorantki w tych badaniach prezentowanych w poszczególnych publikacjach, co nieco utrudnia ocenę realnego zaangażowania Doktorantki w tę zespołową pracę. Dopiero lektura oświadczeń współautorów, oświadczeń samej Doktorantki oraz rozdziału „Wnioski” wyjaśnia, że główne badania prezentowane w tych publikacjach (produkcja RFT w powiązaniu z ilością i stopniem redukcji koenzymu Q) były wykonane przez Doktorantkę. W rozdziale „**Wnioski**” Doktorantka już bardzo precyzyjnie opisała swoje najważniejsze osiągnięcia badawcze. Wnioski są sformułowane bardzo poprawnie i w pełni oddają osiągnięcia Doktorantki w prezentowanych badaniach.

Dysertację doktorską zamyka zestaw oświadczeń współautorów wskazujących zakres ich pracy, wykaz pozostałych publikacji Pani Karoliny Dominiak (trzy pozycje z czego w jednej pracy przeglądowej Doktorantka jest pierwszym autorem) oraz dołączono kopie publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej.

Trzeba zaznaczyć, że badania opisane przez Doktorantkę w pracy doktorskiej są nowatorskie. Po raz pierwszy podkreślają rolę puli zredukowanego koenzymu Q, zarówno na poziomie tkankowym, jak i mitochondrialnym, w obronie przed wzmożoną produkcją RFT oraz rolę puli utlenionego koenzymu Q w regulacji produkcji RFT i utrzymaniu prawidłowego działania łańcucha oddechowego i fosforylacji oksydacyjnej w odpowiedzi na stres oksydacyjny. Należy zaznaczyć, że publikacje wchodzące w skład rozprawy podlegały już wnikliwemu procesowi merytorycznej recenzji przez niezależnych recenzentów, ekspertów z dziedziny, którzy docenili wartość merytoryczną prezentowanych wyników. W związku z

powyższym, w mojej recenzji skoncentrowałam się szczególnie na ogólnej ocenie badań przeprowadzonych przez mgr Karolinę Dominiak oraz na ocenie strony formalnej rozprawy doktorskiej.

Podsumowanie

Rozprawa doktorska Pani mgr. Karoliny Dominiak prezentuje bardzo wysoki poziom naukowy, biorąc pod uwagę rangę rozwiązywanego problemu, jakości badań i niezwykle wysoką rangę czasopism, w których zostały opublikowane wyniki. Jeszcze raz należy podkreślić, że założenia pracy są dobrze przemyślane, w pełni zrealizowane, a uzyskane wyniki mają szeroki zakres, są wartościowe i wnoszą istotny wkład w poznanie działania mitochondrialnego łańcucha oddechowego, szczególnie roli koenzymu Q. Prace stanowiące integralną część rozprawy doktorskiej i znajdują uznanie w międzynarodowym środowisku naukowym.

Rozprawa doktorska w pełni spełnia warunki określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2017 r. poz 1789). Biorąc pod uwagę powyższe, przedkładam wniosek do Rady Naukowej dyscypliny nauki biologiczne Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie wnoszę o **wyróżnienie** rozprawy doktorskiej Pani Mgr. Karoliny Dominiak.

Prof. Joanna Szczepanowska

