



Uniwersytet Łódzki

Wydział Biologii i Ochrony Środowiska

dr hab. Paweł Nowak, prof. nadzw. UŁ
Katedra Biochemii Ogólnej
Instytut Biochemii UŁ
ul. Pomorska 141/143
90-236 Łódź

Łódź, 3 lutego 2017 r.

Ocena pracy doktorskiej

mgr. Marcina Talara

pt. „Zmiany ekspresji i aktywności COX-2 w warunkach hiperglikemii oraz mechanizmy regulacji wazomotoryki naczyń wieńcowych w zwierzęcych modelach cukrzycy”

Promotor pracy – prof. dr hab. Cezary Watała

Promotor pomocniczy – dr Tomasz Przygodzki

Zgodnie z definicją przyjętą przez Światową Organizację Zdrowia (WHO, ang. *World Health Organization*) cukrzyca jest to grupa chorób metabolicznych charakteryzująca się hiperglikemią wynikającą z defektu produkcji lub działania insuliny wydzielanej przez komórki beta trzustki. Przewlekła hiperglikemia wiąże się z uszkodzeniem, zaburzeniem czynności i niewydolnością różnych narządów, szczególnie oczu, nerek, nerwów, serca i naczyń krwionośnych. Chorzy na cukrzycę są narażeni na wcześniejsze pojawienie się zmian miażdżycowych, ich większą rozległość oraz cięższy przebieg choroby. Hiperglikemia zwiększa 2-4-krotnie ryzyko rozwoju choroby niedokrwiennej, a komplikacje sercowo-naczyniowe są w 70% przyczyną zgonów osób chorujących na cukrzycę. Upośledzenie funkcji endotelium w warunkach hiperglikemii związane jest m.in. z zaburzonym wydzielaniem tlenu azotu, który jest podstawowym czynnikiem wazodylatacyjnym jak również ograniczającym aktywację płytek krwi. Wynikiem takiej patologii jest istotne zmniejszenie przepływu krwi w naczyniach, co prowadzi do licznych powikłań późnocukrzycowych oraz do zwiększonej gotowości prozakrzepowej.

W obowiązującej obecnie teorii patogenezы miażdżycы, zmiany w naczyniach krwionośnych mają charakter zapalno-zakrzepowy. Pierwotną zmianą wydaje się proces zapalny zachodzący w obrębie śródbłónka. Hiperglikemia przyczynia się do wzrostu stężenia czynników będących mediatorami stanu zapalnego i adhezji monocytów, limfocytów i płytek

krwi do ściany naczyniowej. Powoduje także nasilenie stresu oksydacyjnego, a co za tym idzie zwiększoną produkcję wolnych rodników tlenowych i zwiększoną degradację tlenu azotu.

Środowisko hiperglikemiczne jest jednym z czynników stymulujących ekspresję cyklooksygenazy 2 (COX-2) przez komórki śródbłonna. Doniesienia literaturowe na temat udziału COX-2 w regulacji hemostazy i wazomotoryki naczyń wieńcowych są sprzeczne. Istnieją doniesienia naukowe wskazujące, że zwiększona ekspresja/aktywność COX-2 powoduje wzrost syntezy wazoaktywnych prostaglandyn (PGI₂ i PGE₂), których obecność ma być kluczowa do kompensacji przepływu wieńcowego w warunkach zaburzonej czynności eNOS. Z drugiej strony są doniesienia naukowe, których konkluzją jest stwierdzenie, że aktywacja COX-2 w cukrzycy prowadzi do nadprodukcji TXA₂, powodującego silny skurcz naczyń krwionośnych.

Z uwagi na ważkość problemu stwierdzam, że przedłożona mi do oceny rozprawa doktorska stanowi cenny wkład w badania nad mechanizmami zachodzącymi w ścianie naczyń krwionośnych serca oraz roli COX-2 w przebiegu cukrzycy. Wyjaśnienie procesów przebiegających w śródbłonku naczyń wieńcowych w środowisku hiperglikemicznym, może wyznaczyć nowe kierunki terapii i przyczynić się do zmniejszenia liczby zgonów z powodu komplikacji sercowo-naczyniowych osób chorych na cukrzycę.

Recenzowana praca doktorska jest liczącym łącznie 127 strony opracowaniem, zawierającym 25 rycin, 4 tabele i 98 pozycji literaturowych, których dobór nie budzi zastrzeżeń. Cytowane prace w zdecydowanej większości zostały opublikowane w ostatnich 8 latach.

Rozprawa ma układ typowy dla tego rodzaju dysertacji. Zawiera następujące rozdziały: *Wstęp teoretyczny, Założenia i cele pracy, Materiały i metody, Wyniki, Dyskusja, Wnioski, Literatura* oraz *Streszczenie* w języku polskim i angielskim. Autor zamieścił także na początku pracy alfabetyczny wykaz stosowanych skrótów i symboli, a na końcu spis rycin i tabel oraz listę swoich publikacji i komunikatów. Z punktu widzenia formalnego i edytorskiego praca przygotowana jest z dużą starannością i co należy podkreślić napisana jest poprawną polszczyzną.

Liczący 21 stron *Wstęp teoretyczny* stanowi znakomite wprowadzenie do tematyki badawczej rozprawy. Autor w sposób ciekawy, przejrzysty i rzeczowy przedstawia mechanizmy powstawania oraz rolę biologiczną prostanoidów. Opisuje różnice w budowie i działaniu biologicznym izoform cyklooksygenazy, a następnie omawia aktualne wyniki badań z zastosowaniem inhibitorów COX-2. Końcowy podrozdział jest przeglądem najnowszej literatury na temat roli COX-2 w cukrzycy.

W kolejnym rozdziale pracy Doktorant precyzyjnie uzasadnia podjęcie tematu badań oraz formułuje trzy ogólne i cztery szczegółowe cele pracy:

1. Określenie udziału COX-2 w regulacji podstawowego przepływu wieńcowego w sercach gryzoni laboratoryjnych z cukrzycą STZ i gryzoni z cukrzycą uwarunkowaną genetycznie;
2. Określenie udziału COX-2 w regulacji rozkurczu naczyniowego zależnego od komórek śródbłonna w tych modelach;
3. Określenie udziału COX-2 w produkcji wazoaktywnych prostaglandyn tj. PGI₂ oraz PGE₂;

4. Określenie wpływu hiperglikemii na aktywność katalityczną obu podjednostek COX-2;
5. Zbadanie możliwości zachodzenia procesu glikacji COX-2 na modelu izolowanego enzymu COX-2;
6. Określenie profilu ekspresji COX-2 w modelu zwierzęcym hiperglikemii;
7. Określenie profilu adhezji *in vivo* płytek krwi do śródbłonna naczyniowego u zwierząt zdrowych i cukrzycowych oraz sprawdzenie w jaki sposób swoista inhibicja COX-2 zmienia stopień tej adhezji.

Przedstawione cele pracy posłużyły do weryfikacji siedmiu odpowiadających celom hipotez badawczych.

Doktorant w rozdziale *Materiały i metody* szczegółowo opisuje zwierzęta wykorzystywane w badaniach oraz sposób ich traktowania podczas wykonywania eksperymentów. Na wykonywanie badań z udziałem zwierząt Autor uzyskał zgodę Lokalnej Komisji Etycznej.

W podrozdziale *Metody* Autor zapoznaje czytelnika z metodologią badań, dobraną znakomicie dla realizacji postawionych celów pracy. Na podkreślenie zasługuje fakt, że Doktorant w trakcie badań stosował najnowocześniejszą i unikatową aparaturę naukową (m.in. aparat Langendorffa do pomiaru przepływu wieńcowego, czy też zestaw do obserwacji adhezji płytek krwi w warunkach *in vivo*).

Rezultaty przeprowadzonych badań zaprezentowane zostały w formie złożonych, prawidłowych pod względem merytorycznym i graficznym 19 rycin i 4 tabel. Poza sposobem prezentacji wyników, uderza duża dojrzałość i dociekliwość w ich interpretacji oraz wyciąganiu wniosków.

Dyskusja licząca 28 stron została podzielona na podrozdziały. Ułatwiło to zarówno jej prowadzenie, jak i odbiór. Autor w sposób kompetentny skonfrontował wyniki swoich badań z wynikami innych autorów. Potwierdził tym samym dobrą znajomość literatury przedmiotu i właściwy krytycyzm do wyników badań, zarówno własnych, jak i danych literaturowych. Dyskusję kończy 7 prawidłowo sformułowanych wniosków.

Przedstawione w recenzowanej rozprawie doktorskiej wyniki potwierdzają ważną rolę cyklooksygenazy 2 w regulacji wazomotoryki naczyniowej, ale też wskazują na złożoność i zależność tego zjawiska od rodzaju łożyska naczyniowego i typu cukrzycy. Postulowana hipoteza zwiększonej w hiperglikemii ekspresji COX-2, związana z mechanizmem kompensacji przepływu naczyniowego przy zaburzonym tworzeniu tlenu azotu, nie została potwierdzona w trakcie przeprowadzonych badań. Zaobserwowano natomiast zwiększoną ekspresję genów PGI₂ oraz PGE₂ u zwierząt cukrzycowych. Nie wykazano również, aby aktywność COX-2 w naczyniach zwierząt z cukrzycą miała wpływ na właściwości adhezyjne płytek krwi.

W rozprawie doktorskiej znalazłem kilka drobnych błędów (głównie edytorskich) i uchybień, które wynikają zapewne z pośpiechu, w jakim pisane są rozprawy doktorskie. Pomimo, że nie obniżają one bardzo dobrego pod względem merytorycznym poziomu pracy, chciałym z obowiązku recenzenta przekazać Autorowi niektóre z nich:

- Tromboksan nie jest prostaglandyną (różnice w budowie pierścienia);
- Str. 12 - tytuł podrozdziału 1 *Wstęp teoretyczny* jest niezgodny ze spisem treści;

- Str. 14 - PGI2 wykazuje synergizm działania z tlenkiem azotu, a nie z syntazą tlenku azotu;
- Str. 15 - „aktywne produkty metabolizmu COX ulegają przemianie do produktów nieaktywnych w wyniku uwodnienia.. „ - powinno być ” w wyniku hydrolizy”;
- Str.17 - „...przyłączenie 2 moli tlenu..” - powinno być „ 2 cząsteczek tlenu”;
- Str. 40 - „Oznaczanie poziomu glikowanej HbA1c – powinno być – „Oznaczanie stężenia glikowanej HbA1c.”;
- Str. 5 i 56 -w spisie treści i w tytule podrozdziału 6 Autor informuje, że adhezję płytek do śródbłonna naczyniowego badał u szczurów, podczas gdy z opisu metody wynika, że były to myszy. Błąd ten pojawia się również w rozdziale *Wyniki* (str. 86-89), gdzie grupą kontrolną w badaniach miałyby być szczury zamiast myszy;
- Str. 74 - tytuł podrozdziału 4 jest niezgodny ze spisem treści.

Chciałbym również, aby Autor wyjaśnił dlaczego w badaniach z wykorzystaniem izolowanego enzymu COX-2 zastosował glukozę/difosfofruktozę tylko w jednym, bardzo wysokim stężeniu 300 mM. Jaki był stosunek molowy białka do heksozy w tych doświadczeniach? Argumenty użyte w dyskusji, tłumaczące konieczność stosowania tak wysokiego stężenia glukozy, poparte cytowaniem prac innych naukowców (poz.81 i 82), nie do końca mnie przekonują.

W podsumowaniu stwierdzam, że przedłożona mi do oceny praca doktorska ma bardzo wysoką wartość poznawczą. Autor dysertacji zrealizował obszerny i ambitny program badań. O ich randze świadczy fakt, iż były one finansowane z pięciu projektów badawczych (w tym projektów Etiuda i Preludium). Zastosowanie przez Doktoranta różnorodnych, nowoczesnych technik świadczy o znakomitym opanowaniu warsztatu badawczego. Sposób analizy wyników, wnioskowanie oraz przedstawione hipotezy świadczą o dużej wiedzy oraz dojrzałości naukowej Doktoranta.

Rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art.13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. nr 65, poz.595 z późn.zm.) Część wyników została już opublikowana w renomowanych czasopismach naukowych. W związku z powyższym, wnoszę do Wysokiej Rady Wydziału Nauk o Zdrowiu UM w Łodzi o dopuszczenie mgr Marcina Talara do dalszych etapów przewodu doktorskiego oraz publicznej obrony pracy doktorskiej. Wnioskuje także o wyróżnienie pracy.



Paweł Nowak