

Kraków, 13.01.2017r.

Szanowna Pani Profesor  
dr hab. n. med. Elżbieta Smolewska  
Dziekan ds. Nauki Wydziału Nauk o Zdrowiu  
Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Marcina Talara pt. „Zmiany ekspresji i aktywności COX-2 w warunkach hiperglikemii oraz mechanizmy regulacji wazomotoryki naczyń wieńcowych w zwierzęcych modelach cukrzycy”.

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska została przygotowana w Zakładzie Zaburzeń Krzepnięcia Krwi Katedry Nauk Biomedycznych Uniwersytetu Medycznego w Łodzi. Promotorem rozprawy jest prof. dr hab. Cezary Watała. Źródłami finansowania rozprawy były następujące projekty: Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego (N N401 265839), Narodowego Centrum Nauki (2012/06/A/NZ5/00069, 2014/15N/NZ3/02200 i 2015/16/T/NZ3/00170) oraz Europejski Fundusz Rozwoju Regionalnego w programie Innowacyjnej Gospodarki (POIG.01.01.02-00-069/09).

Celem rozprawy była kompleksowa analiza ekspresji izoenzymu cyklooksygenazy COX-2 w warunkach naśladujących przebieg cukrzycy u człowieka oraz poznanie składowych mechanizmu regulacji napięcia naczyń wieńcowych w warunkach hiperglikemii. Doktorant posłużył się dwoma zwierzęcymi modelami cukrzycy wywołanej u laboratoryjnych gryzoni uszkodzeniem komórek beta wysepek trzustki streptozotocyną (STZ) albo konstytutywnym modelem zaburzeń metabolicznych spowodowanym homozygotyczną mutacją receptora dla leptyny u myszy – genotyp *db/db*. Badania farmakologiczne wykonano na izolowanym preparacie serca w modelu cukrzycy streptozotocynowej u szczurów Sprague-Dawley oraz u myszy *db/db* techniką Langendorffa. Uzupełnieniem eksperymentów na zwierzętach było poszukiwanie dowodów na nieenzymatyczną glikację COX-2 z wykorzystaniem izolowanego enzymu owczego, oraz badania obrazowe nad oddziaływaniem płytek krwi z komórkami śródbłonna naczyń krezki u myszy z cukrzycą STZ.

Wybór badań zrealizowanych w ramach rozprawy doktorskiej mgr Marcina Talara nie budzi zastrzeżeń co do klinicznej istotności zagadnień. Cukrzyca jest częstą chorobą, jej chorobowość wzrosła w ciągu kilku dekad z 1% do ponad 6% populacji. Model STZ jest eksperymentalnym odpowiednikiem cukrzycy typu I u człowieka, choroby spowodowanej uszkodzeniem komórek wysepek trzustki wskutek zapalenia o podłożu autoimmunoagresji. Mutacja powodująca uszkodzenie genu receptora dla leptyny, obok mutacji samej leptyny, jest uznanym modelem mysim zaburzeń metabolicznych odpowiadających cukrzycy typu II z dominującym mechanizmem oporności na działanie insuliny. Niezależnie od przyczyny cukrzycy, pozostaje funkcją czasu pojawienie się u chorych na tę chorobę objawów mikro- i makroangiopatii spowodowanych hiperglikemią. Współcześnie u chorych na chorobę niedokrwienną serca, lub wśród osób z udarem mózgu, chorzy na cukrzycę stanowią około 30%. Stąd zasadnicze znaczenie ma ustalenie podobieństwa lub rozbieżności w działaniu powszechnie stosowanych niesteroidowych leków przeciwzapalnych (NLPZ) będących inhibitorami cyklooksygenaz u chorych na cukrzycę w odniesieniu do populacji normoglikemicznej. Szczególne miejsce zajmuje tu profilaktyka chorób układu sercowo-naczyniowego wykorzystująca przeciwpłytkowe działanie kwasu acetylosalicylowego. Niepowodzenia kliniczne w stosowaniu koksycybów, wysoce selektywnych lub wybiórczych inhibitorów COX-2 dowiodły wzrostu ryzyka epizodów sercowo-naczyniowych. Wyjaśnienie, czy w cukrzycy zachodzi ryzyko nasilenia powikłań naczyniowych związane z hamowaniem aktywności cyklooksygenaz uznaję za bardzo ambitny i klinicznie ważny temat o zasadniczym znaczeniu praktycznym. Jednocześnie chciałbym podkreślić, że miejsce realizacji rozprawy oraz promotorska opieka prof. Cezarego Watały jest dla mnie gwarantem przemyślnego planu badań, solidności wyników i wiarygodności analiz statystycznych.

Przystępując do szczegółowego omówienia rozprawy, która ma typową formę i układ typograficzny dokonam zwięzłego omówienia jej podrozdziałów i równoczesnej – z obowiązku recenzenta – krytycznej oceny tekstu i materiału ikonograficznego, zarówno w warstwie merytorycznej jak i edytorskiej.

Streszczenie rozprawy, zajmujące pierwsze 3 strony jest dobre i zwięzłe odzwierciedla bogaty materiał eksperymentalny i uzyskane wyniki podkreślając istotne i nowe ustalenia.

Na 20 stronach Wstępu Doktorant przedstawił wprowadzenie do fizjologii mediatorów lipidowych pochodnych kwasu arachidowego. Skupiając się na prostanoidach i ich szlakach

syntezy omówił różnice w budowie dwóch izoenzymów cyklooksygenaz oraz wynikające z nich odmienności farmakodynamiczne działania NLPZ. Zwrócił uwagę na rolę śródbłonkowej syntazy tlenu azotu oraz jej indukowalnego izoenzymu, a także czynnościowe współdziałanie prostacykliny i tlenu azotu w hamowaniu agregacji płytek krwi. We Wstępie naświetlony został również udział COX-2 w regulacji przepływu naczyniowego oraz niejednoznaczne ustalenia dotyczące roli tego izoenzymu w patomechanizmie angiopatii cukrzycowej, z możliwością bezpośredniej glikacji białka enzymatycznego. Wstęp jest spójnym wprowadzeniem do biochemii i farmakologii układu cyklooksygenaz i ich prostanoidowych produktów w regulacji przepływu i hemostazy naczyniowej. Równocześnie Doktorant nie ustrzegł się od drobnych błędów z których wspomnę o błędnym przypisaniu androgenom (testosteron) zdolności aktywacji receptora dla tromboksanu (str. 14). W istocie hormon ten powoduje zwiększenie ekspresji syntazy tromboksanu. Również przypisanie transporterowi prostaglandyn (OATP) zdolności ich 15-dehydrogenacji jest nieprawdziwe. Dokonuje jej enzym, swoista dehydrogenaza, inaktywujący szybko prostaglandyny, zwłaszcza w krążeniu płucnym (str. 15, opis ryciny). Nazwanie związku 6-keto PGF1 alfa stabilnym analogiem prostacykliny (str. 23) jest również błędem, ponieważ jest to stabilny lecz nieaktywny metabolit tej prostaglandyny obecny we krwi oraz innych płynach ustrojowych.

Szczegółowe cele rozprawy zostały sformułowane jednoznacznie i układają się w logiczną całość. Hipotezy badawcze, stanowiące sformalizowany zapis celów, odnoszą się bezpośrednio do przeprowadzonych eksperymentów, co ułatwia prześledzenie wyników, a następnie ich potwierdzenie lub odrzucenie na podstawie wyników. Nie mam krytycznych uwag do tej części rozprawy.

Opis materiałów i metod badawczych jest bardzo mocną stroną rozprawy doktorskiej. Zostały wymienione wszystkie odczynniki chemiczne, opisane zostały zwierzęta wykorzystane w eksperymentach i warunki ich hodowli. Doktorant uzyskał zgody Lokalnej Komisji Etycznej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi na wykonanie tych badań. Również dokładne są opisy procedury indukcji cukrzycy pod wpływem STZ, a także modelu Langerdorffa izolowanego serca, wykorzystanego w pomiarach przepływu wieńcowego. Doktorant wykonał również interesujące eksperymenty biochemiczne dotyczące pomiaru aktywności COX-2 w środowisku o zwiększonym stężeniu glukozy, pomiary dotyczyły osobno aktywności oksygenazowej i peroksydazowej enzymu. Przeprowadzone było również

sekwencjonowania białka w celu zbadania jego glikacji. Wykonane oznaczenia techniką immunoblotów i barwienia immunohistochemicznego preparatów aorty posłużyły ocenie ekspresji białkowej i zostały uzupełnione ilościową analizą transkryptu i cytometrią przepływową komórek śródbłonna. Aktywność COX-2 w preparatach Langendorffa oraz krążkach aorty szczura została oszacowana na podstawie produkcji prostacykliny i PGE2 w warunkach hamowania COX-1 lub COX-2. Wykonano również eksperymenty dynamiczne dotyczące oddziaływania znakowanych płytek krwi z komórkami śródbłonna naczyń krezki w technice wideorejestracji i analizy obrazu. Całość metodologii składa się na bardzo szeroki warsztat badawczy, którego szczegółowość opisu nie budzi wątpliwości co do samodzielności Doktoranta i jego biegłości w zakresie technik farmakologicznych, biochemicznych i molekularnych. Jedyna uwaga krytyczna do tej części rozprawy dotyczy mikroskopowej analizy adhezji płytek do śródbłonna (str. 56). W tytule podrozdziału 6. Doktorant sugeruje eksperymenty wykonane na szczurach, po czym w następnym zdaniu jest mowa o mysim modelu cukrzycy. W korespondującej części wyników również mowa o myszach albo szczurach, stąd domyślnie eksperymenty z naczyniami krezki uznałem za powtarzane na obu gatunkach gryzoni. Jednak Dyskusja sugeruje jedynie model myszy. Obawiam się, że Doktorant pomylił opisy tych eksperymentów.

Wyniki badań Doktorant zebrał w czytelnej formie 4 tabeli i 18 rycin, wśród których dwie są mikrofotografiami cyfrowymi. Omówienie wyników jest zwięzłe i odwołuje się do wielopanelowych wykresów statystycznych bardzo ułatwiających porównania międzygrupowe dla zwierząt z cukrzycą oraz kontrolnych, w różnych układach stymulacji i pomiaru. Dzięki temu mgr Talar uniknął częstego błędu polegającego na niepotrzebnym powieleniu wyników w postaci numerycznej wraz z towarzyszącym wykresem statystycznym. Doktorant słusznie uznał uzyskane podczas badania w preparacie izolowanego serca pomiary regulacji przepływu wieńcowego u szczurów STZ i myszy *db/db* za kluczowe dla rozprawy w kontekście dotyczącym udziału COX-2. Stwierdził dwa interesujące zjawiska: zmniejszoną rezerwę wieńcową przepływu u homozygot *db/db*, niezależnie od pośredniego działania acetylocholino, czy też blokowania syntezy tlenku NO lub podania donora tej cząsteczki. Nasuwa to podejrzenie uszkodzenia śródbłonna naczyń wieńcowych oraz niewrażliwość mięśni gładkich na działanie rozkurczowe NO. W zakresie zanalizowanych w tym samym modelu prostanoidów: metabolitu prostacykliny i PGE2, Doktorant nie stwierdził różnic w ich produkcji, ani jej zmniejszenia pod wpływem selektywnego hamowania COX-2. Obserwował natomiast zwiększoną podstawową produkcję PGE2 i jej spadek korelujący ze

zmniejszeniem przepływu wieńcowego. Równocześnie wykazał, stosując kilka stężeń agonisty dla receptora prostacykliny, że odpowiedź rozkurczowa naczyń wieńcowych u myszy homozygotycznych *db/db* jest zmniejszona mimo niezmienionej gęstości receptorów IP. Efekty analogicznych eksperymentów w modelu szczurów STZ nie były tak widoczne, co skłoniło do późniejszej dyskusji różnic między dwoma modelami choroby.

Innym bardzo interesującym wynikiem jest eksperymentalne udowodnienie hamowania aktywności cykloksygenazy, zarówno oksygenazowej, a przede wszystkim peroksydazowej jej funkcji pod wpływem hiperglikemii, przy czym najsilniejszy efekt przybrał wymiar podobny do działania difosfofruktozy. Wykorzystując technikę sekwencjonowania białka COX-2 wykazał, że kilka aminokwasów polipeptydu może podlegać wczesnej glikacji, wśród nich 3 reszty lizynowe znajdujące się blisko kieszeni substratowej COX-2. Porównanie ekspresji COX-2 w aorcie szczura, na poziomie immunodetekcji cząsteczki białka techniką western blot i odsetka COX-2 dodatnich komórek śródbłonna aorty nie wykazało różnic zależnych od fenotypu cukrzycy. Jednocześnie, w modelu STZ obecność transkryptów dla COX-2 była bardzo istotnie zmniejszona. Całkowita zawartość COX-2 w lizatach komórkowych była również zmniejszona w cukrzycy. Rozbieżność tych wyników jest zależna od techniki pomiaru swoistego białka. Przy braku różnic w oznaczeniach techniką immunoblotu i barwień wewnątrzkomórkowych widoczna jest istotna różnica w pomiarze pośrednią immunodetekcją w technice ELISA lub analizie transkryptów. Budzi to naturalne pytanie co do przyczyny zjawiska, na które Doktorant udzielił odpowiedzi w Dyskusji rozprawy. W preparatach bezpośrednich aorty poddanych immunodetekcji COX-2 ekspresja była obniżona w cukrzycy wywołanej STZ, ponadto morfologicznie komórki śródbłonna były u tych zwierząt zmienione. Inną ciekawą obserwacją stanowiącą problem interpretacyjny są wyniki czynnościowych pomiarów produkcji prostacykliny i PGE2 w modelu izolowanego krążka aorty. Wskazują na zwiększoną biosyntezę tych mediatorów w modelu cukrzycy. Doktorant rozwikłał zagadkę wykazując zwiększoną ekspresję swoistych syntaz tych prostaglandyn w modelu cukrzycy STZ. W naczyniach krezkowych żylnych i tętniczych cukrzyca doświadczalna wywołała istotne zmniejszenie szybkości przepływu płytek krwi. Blokowanie aktywności COX-2 powodowało wzrost liczby adherujących leukocytów w naczyniach żylnych. Jednakże obserwacja ta budzi wątpliwość metodologiczną, ponieważ do znakowania użyto przeciwciała łączącego się z płytkami krwi.

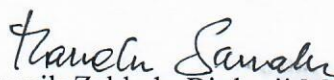
Dyskusja wyników została przeprowadzona na podstawie ponad 50 pozycji literaturowych dotyczących głównie biologii naczyń krwionośnych i cykloksygenaz, w tym

również w kontekście cukrzycy. Doktorant doszukał się opublikowanych uprzednio wyników badań, które były albo zgodne z wynikami własnymi, albo odzwierciedlały przeciwstawne koncepcje. Jest to zapewne traumatyczne doświadczenie naukowe, gdy walidacja własnych wyników nie znajduje jednoznacznego potwierdzenia w aktualnym stanie wiedzy. Uważam jednak, że Doktorant dobrze poradził sobie z tym problemem podkreślając obserwacje własne, które wnoszą nowe spojrzenie na zagadnienie regulacji przepływu naczyniowego zależne od COX-2 w modelu cukrzycy. Najważniejsze z własnych wyników to brak zwiększonej ekspresji COX-2 w komórkach śródbłonna naczyń tętnicznych, możliwość glikacji enzymu oraz zależne od modelu cukrzycy zmiany wrażliwości na rozkurczowe działanie NO i czynników go uwalniających.

W podsumowaniu, przygotowując rozprawę doktorską mgr Marcin Talar dowiódł swoich umiejętności w zakresie sformułowania istotnych dla problemów klinicznych hipotez badawczych, poprawnego doboru modeli eksperymentalnych, wykonania badań i interpretacji wyników. Zebrane w rozprawie wyniki zostały opublikowane w 9 oryginalnych pracach, wśród nich w jednej Doktorant jest pierwszym autorem. Lektura rozprawy nie pozostawia wątpliwości co do oryginalności jego badań i umiejętności rozwiązywania problemów naukowych wymaganej przy ubieganiu się o stopień naukowy. Wymienione w powyższej recenzji niedociągnięcia i pomyłki świadczą co najwyżej o pośpiechu lub nadmiarze danych, spośród których nieliczne umknęły uwadze Doktoranta. W toku ostatecznej edycji rozprawy mogą z łatwością zostać wyeliminowane.

Powołując się na powyższą pozytywną ocenę rozprawy doktorskiej mgr Marcina Talara uprzejmie proszę Panią Dziekan o przedstawienie opinii na forum Rady Wydziału i podjęcie dalszych kroków w przewodzie doktorskim mgr Marcina Talara.

prof. dr hab. n. med. Marek Sanak

  
Kierownik Zakładu Biologii Molekularnej i Genetyki Klinicznej  
II Katedra Chorób Wewnętrznych im. prof. Andrzeja Szczeklika  
Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum