



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, 5 kwietnia 2018 r.

**Ocena pracy doktorskiej  
mgr Karoliny Siewiery**

**pt. „Metabolizm tlenowy jako kluczowy modulator aktywacji płytek krwi -  
zmiany w metabolizmie energetycznym oraz w aktywności płytkowej  
cyklooksygenazy 1 w warunkach podwyższonego stężenia glukozy w  
środoisku - badania *in vitro* oraz *in vivo*”**

**Promotor pracy – prof. dr hab. Cezary Watała**

Cukrzyca to choroba metaboliczna o różnej etiologii charakteryzująca się hiperglikemią wynikającą z defektu produkcji lub działania insuliny wydzielanej przez komórki beta trzustki, bądź też występowaniem obu tych zjawisk. 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. W grupie chorych na cukrzycę obserwuje się takie samo ryzyko wystąpienia zawału mięśnia sercowego, jak w grupie chorych bez cukrzycy, którzy przebyli wcześniej zawał serca. Stało się to podstawą stwierdzenia, że cukrzyca stanowi ekwiwalent choroby niedokrwiennej serca. Liczne badania wskazują, że środowisko hiperglikemiczne jest jednym z głównych czynników zwiększających potencjał prokoagulacyjny krwi krążącej w naczyniach. Do powstania stanu protrombotycznego przyczyniają się zmiany w stężeniu i aktywności czynników i inhibitorów krzepnięcia, zmniejszony potencjał fibrynolityczny, zaburzenia funkcji śródbłonka oraz elementów morfotycznych krwi, w tym płytek krwi. Płytki

krwi osób chorych na cukrzycę charakteryzują się hiperreaktywnością ze wzmożoną adhezją, aktywacją i agregacją, jak również zmniejszoną wrażliwością na czynniki przeciwagregacyjne. Jedną z przyczyn patologii funkcjonalnej płytek krwi w cukrzycy jest nadmierna produkcja TXA<sub>2</sub>. Doniesienia literaturowe na temat roli COX-1 w tym zjawisku są sprzeczne. Nieliczne są również prace dotyczące wpływu przewlekłej hiperglikemii na funkcjonowanie mitochondriów w płytkach krwi.

Z uwagi na ważkość problemu stwierdzam, że przedłożona mi do oceny rozprawa doktorska stanowi cenny wkład w badania nad mechanizmami zachodzącymi w płytkach krwi w przebiegu cukrzycy. Wyjaśnienie przyczyn zwiększonej przemiany kwasu arachidonowego do TXA<sub>2</sub>, a także poznanie zależności pomiędzy funkcjonowaniem mitochondriów płytek krwi w środowisku hiperglikemicznym a aktywacją tych komórek, może wyznaczyć nowe kierunki terapii i przyczynić się do zmniejszenia liczby zgonów z powodu komplikacji sercowo-naczyniowych osób chorych na cukrzycę.

Przedstawiona mi do recenzji praca doktorska jest liczącym łącznie 155 stron opracowaniem, zawierającym 17 rycin, 6 tabel i 235 pozycji literaturowych, których dobór nie budzi większych zastrzeżeń, poza faktem, że tylko 10% cytowanych prac pochodzi z ostatnich 5 lat. Rozprawa ma układ typowy dla tego rodzaju dysertacji. Zawiera następujące rozdziały: *Wstęp teoretyczny*, *Założenia i cele pracy*, *Materiały i metody*, *Wyniki*, *Dyskusja*, *Podsumowanie i Wnioski*, *Literatura* oraz *Streszczenie* w języku polskim i angielskim. Autorka zamieściła także na początku pracy źródła finansowania badań, listę artykułów naukowych, w których wyniki przedstawione w pracy zostały opublikowane, alfabetyczny wykaz stosowanych skrótów i symboli, a na końcu spis rycin i tabel oraz listę swoich wszystkich osiągnięć naukowych. Z punktu widzenia formalnego i edytorskiego praca przygotowana jest z bardzo dużą starannością i co należy podkreślić napisana jest ładną, poprawną polszczyzną. Muszę również przyznać, że całokształt dorobku publikacyjnego i aktywności naukowej Doktorantki jest znacząco ponadprzeciętny. W skład Jej dorobku wchodzi łącznie 17 prac, w większości opublikowanych w czasopismach z listy A MNiSW, 2 rozdziały w angielskojęzycznych książkach, a także 18 komunikatów przedstawionych na konferencjach zagranicznych i 23 komunikaty na konferencjach krajowych. Ponadto Doktorantka uzyskała z NCN finansowanie dwóch projektów własnych (Preludium i Etiuda).

Liczący 38 stron *Wstęp teoretyczny* stanowi dobre wprowadzenie do tematyki badawczej rozprawy. Autorka w sposób przejrzysty i rzeczowy przedstawia mechanizmy powstawania stanu protrombotycznego w warunkach hiperglikemii, ze szczególnym uwzględnieniem roli płytek krwi w tym procesie. W kolejnych podrozdziałach opisuje tlenozależne mechanizmy regulacji aktywacji płytek krwi, skupiając się na omówieniu udziału cyklooksygenazy 1 w przemianach kwasu arachidonowego w warunkach prawidłowych i w przebiegu cukrzycy. Końcowy podrozdział jest przeglądem literatury na temat konsekwencji hiperglikemii dla funkcjonowania mitochondriów w płytkach krwi. Część teoretyczna pracy została zilustrowana 5 świetnie przygotowanymi rycinami, które znacząco ułatwiają czytelnikowi zrozumienie poruszanej tematyki.

W kolejnym rozdziale pracy Doktorantka krótko uzasadnia podjęcie tematu badań, precyzyjnie formułuje cele pracy oraz hipotezy badawcze. Głównym celem pracy była odpowiedź na pytanie, jak stan przewlekłej hiperglikemii może wpływać na aktywność i ekspresję COX-1 w płytkach krwi. Dodatkowym celem badań było poznanie zależności

pomiędzy funkcjonowaniem mitochondriów płytek krwi w środowisku hiperglikemicznym a aktywacją tych komórek.

Przedstawione cele pracy posłużyły do weryfikacji siedmiu hipotez badawczych.

Główne hipotezy badawcze:

1. Stan przewlekłej hiperglikemii prowadzi do wzrostu ekspresji COX-1 w płytkach krwi zwierząt z cukrzycą doświadczalną.
2. Stan przewlekłej hiperglikemii prowadzi do zwiększenia aktywności enzymu COX-1 u zwierząt z cukrzycą streptozotocynową.
3. W warunkach hiperglikemii dochodzi do glikacji COX-1.
4. Glikacja enzymu COX-1 prowadzi do wzrostu jego aktywności.

Dodatkowe hipotezy badawcze:

5. Stan przewlekłej hiperglikemii prowadzi do wzrostu metabolizmu mitochondrialnego w płytkach krwi zwierząt z cukrzycą streptozotocynową oraz w płytkach krwi inkubowanych z glukozą o wysokim stężeniu w warunkach *in vitro*.
6. Stan przewlekłej hiperglikemii prowadzi do wzrostu potencjału mitochondrialnego w płytkach krwi zwierząt z cukrzycą streptozotocynową.
7. Powyższe zmiany korelują z parametrami aktywacji płytek krwi w cukrzycy

Autorka w rozdziale *Materiały i metody* szczegółowo opisuje zwierzęta wykorzystywane w badaniach oraz sposób ich traktowania podczas wykonywania eksperymentów. Doktorantka posłużyła się dwoma zwierzęcymi modelami cukrzycy: wywołanej chemicznie u szczurów przy pomocy streptozotocyny (cukrzyca typu I) albo spowodowanej homozygotyczną mutacją receptora dla leptyny u myszy (cukrzyca typu II). Na wykonywanie badań z udziałem zwierząt Autorka uzyskała odpowiednie zgody Lokalnej Komisji Etycznej.

W podrozdziale *Metody* Doktorantka zapoznaje czytelnika z obszerną metodologią badań, dobraną adekwatnie do stawianych zadań. Wszystkie wykorzystywane procedury są opisane w sposób umożliwiający ich odtworzenie w innym laboratorium.

*Rezultaty* przeprowadzonych badań przedstawione zostały głównie w formie wielopanelowych, czytelnych rycin (11) i tabel (6), co bardzo ułatwiło porównania międzygrupowe w różnych układach pomiarowych. Omówienie wyników jest zwięzłe, jednocześnie uderza duża dojrzałość i docieklivość w ich interpretacji oraz wyciąganiu wniosków.

Dyskusja licząca 18 stron została przeprowadzona na podstawie 76 pozycji literaturowych i podzielona na 4 podrozdziały. Ułatwiło to zarówno jej prowadzenie, jak i odbiór. Autorka w sposób kompetentny skonfrontowała wyniki swoich badań z wynikami innych autorów. Potwierdziła tym samym dobrą znajomość literatury przedmiotu i właściwy krytycyzm do wyników badań, zarówno własnych, jak i danych literaturowych. Dyskusję kończy krótkie podsumowanie i aż 11 wniosków, które w mojej ocenie są raczej podsumowaniem wyników z kolejnych doświadczeń. Ponadto wniosek 4 „Stan przewlekłej glikemii prowadzi do wzrostu aktywności COX-1” jest przeciwstawny do wniosku 7 „Hiperglikemia prowadzi do zmniejszenia aktywności katalitycznej białka COX-1”

Przedstawione w recenzowanej rozprawie doktorskiej wyniki wskazują na istotną rolę dwóch mechanizmów zależnych od metabolizmu tlenowego w aktywacji płytek krwi w cukrzycy. Potwierdzają ważną rolę cyklooksygenazy 1 w powstawaniu stanu

protrombotycznego w przebiegu cukrzycy, ale też wskazują na złożoność i zależność tego zjawiska od typu cukrzycy. Wskazują również, iż w warunkach hiperglikemicznych dochodzi w płytkach krwi do wzrostu oddychania i potencjału mitochondrialnego, co może potęgować produkcję RFT i większą reaktywność tych komórek.

W rozprawie doktorskiej znalazłem kilka drobnych błędów i uchybień. Nie obniżają one bardzo dobrego pod względem merytorycznym poziomu pracy. Chciałbym jednak z obowiązku recenzenta przekazać Autorce niektóre z nich:

- W tekstach polskojęzycznych przyjętym zwyczajowo separatorem dziesiętnym jest przecinek, a nie kropka, podobnie jak w większości krajów europejskich. Ponadto, zwyczaj ten honorowany jest przez większość programów komputerowych przystosowanych do języka polskiego. Nie widzę powodu, aby odstępować od tego zwyczaju. Dlatego każde odstępstwo od tej zasady będę traktował jako błąd typograficzny.

- To nie stężenie danej substancji wywołuje obserwowany skutek, a substancja użyta w określonym stężeniu jest odpowiedzialna za wywołanie tego skutku. Pisanie w pracach dyplomowych o wpływie stężenia a nie substancji o określony stężeniu jest niestety powszechnie występującym błędem. (str. 54, 122)

- W każdej analizie statystycznej powinna być podana liczebność grupy. Niestety, w kilku miejscach pracy o tym zapomniano (Str. 78, 1.1, str.82, 1.3, str.83, 2.1)

Chciałbym również, zapytać Autorkę o różnice morfologiczne i funkcjonalne między płytkami krwi człowieka a płytkami krwi badanych gryzoni. Jak wyjaśnić fakt, że liczba płytek/ $\mu$ l krwi u szczurów i myszy jest ponad dwukrotnie wyższa niż u człowieka?

Podsumowując stwierdzam, że przedłożona mi do oceny praca doktorska ma bardzo wysoką wartość poznawczą. Autorka dysertacji zrealizowała obszerny i ambitny program badań. O ich randze świadczy fakt, iż były one finansowane z pięciu projektów konkursowych. Zastosowanie przez Doktorantkę różnorodnych, nowoczesnych technik świadczy o doskonałym opanowaniu warsztatu badawczego. Sposób analizy wyników, wnioskowanie oraz przedstawione hipotezy świadczą o dużej wiedzy oraz dojrzałości naukowej Doktorantki. Rezultaty badań przedstawionych w pracy zostały opublikowane w czterech renomowanych czasopismach naukowych (Thrombosis Research 2014, Platelets 2016, Chemico-Biological Interactions 2016, Life Sciences 2016). Doktorantka jest pierwszym autorem w dwóch pracach, w dwóch pozostałych drugim i trzecim, co definiuje Jej kluczowy wkład w ich powstanie.

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.) W związku z powyższym, wnoszę do Wysokiej Rady Wydziału Nauk o Zdrowiu UM w Łodzi o dopuszczenie mgr Karoliny Siewiery do dalszych etapów przewodu doktorskiego oraz publicznej obrony pracy doktorskiej. **Wnioskuje także o wyróżnienie pracy.**

P. Nowak

Paweł Nowak