



O C E N A

Rozprawy na stopień doktora nauk medycznych

Mgr biol. Magdaleny Donejko

***”Ocena działania kwasu hialuronowego na zaburzenia syntezy kolagenu
wywołane przez etanol w fibroblastach skóry ludzkiej”***

Promotor: Prof. UMB dr hab. n. med. Andrzej Przylipiak

Promotor pomocniczy: Dr n. farm. Edyta Rysiak

Zgodnie z uchwałą Rady Wydziału Farmaceutycznego z oddziałem Medycyny Laboratoryjnej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku z 28 maja 2015 roku o powołaniu mnie na recenzenta wyżej wymienionej rozprawy mam zaszczyt przedstawić poniższą opinię.

Przedłożona do oceny praca obejmuje 101 stron tekstu w układzie klasycznym, z zachowaniem następujących proporcji, w tym: Wstęp (35 stron), Cel pracy (1 strona), Materiał i Metody (10 stron), Wyniki (30 stron), Dyskusja (5 stron), wnioski (1 strona), Streszczenie w języku polskim i angielskim (łącznie 3 strony). Rozprawa poprzedzona jest spisem treści (4 strony) oraz przejrzystym wykazem skrótów i terminów (3 strony) W pracy zamieszczono 8 rysunków (wstęp) oraz 14 rycin (wyniki), z podaniem ich spisów. Piśmiennictwo, w układzie alfabetycznym, zawiera 175 pozycji, w większości anglojęzycznych (90%), wśród których zdecydowaną większość stanowią publikacje z lat 2010-2015 (65%).

Autorka była stypendystką programu „Studiuję, badam, komercjalizuję – program wsparcia doktorantów UMB”, Poddziałanie 8.2.1 Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki, współfinansowanego przez Unię Europejską w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego.

Oceniając przedłożoną mi rozprawę na stopień doktora nauk medycznych, dokonam jej charakterystyki w zakresie:

1. wartości poznawczej celu badawczego,
2. poprawności metodycznej,
3. znaczenia naukowego wniosków wynikających z przeprowadzonych doświadczeń,
4. redakcji przedłożonej pracy.

1. Wartość celu badawczego

We wstępie do rozprawy Doktorantka przedstawiła w sposób przejrzysty i uporządkowany aktualną wiedzę związaną z tematem pracy, poczynając od budowy macierzy zewnątrzkomórkowej skóry i jej roli w utrzymaniu integralności tkanek tego narządu. Omówiła dokładnie dwa ważne składniki tejże macierzy, tj. kolageny (białka) oraz kwas hialuronowy (jeden z glikozaminoglikanów), jako dwie najważniejsze substancje, pomiędzy którymi zamierzała zbadać interakcje zachodzące pod wpływem etanolu. Autorka zaprezentowała szczegółowo czynniki mające wpływ na biosyntezę kolagenu oraz na kluczowe etapy tego procesu. Drugi związek, kwas hialuronowy, to szeroko rozpowszechniony składnik tkanek i płynów ustrojowych kręgowców, a jego szczególna obfitość w macierzy zewnątrzkomórkowej naskórka i skóry właściwej oraz niezwykła zdolność do wiązania znacznych ilości wody pozwala utrzymać odpowiednie nawilżenie i napięcie skóry. Dzięki tym właściwościom kwas hialuronowy znajduje szerokie zastosowanie w medycynie, m.in. w próbach leczenia chorób zwyrodnieniowych stawów, chorób oczu, krtani, rekonstrukcji chrząstek stawowych, a także w leczeniu oparzeń i ran skóry. Dalsze części wstępu dotyczą budowy i funkcji receptora β_1 integrynowego oraz receptora insulinopodobnego czynnika wzrostu I (IGF-1R) i ich roli w przekazywaniu sygnału z macierzy zewnątrzkomórkowej do jądra komórkowego poprzez aktywację kaskad sygnałowych z udziałem, m.in., szlaków kinaz FAK i MAP. W wyniku uruchomienia tych procesów ekspresji ulegają geny białek regulujących wzrost i różnicowanie komórki oraz stymulację jej proliferacji z jednoczesnym hamowaniem procesu apoptozy. Efektem jest dwukierunkowa stymulacja procesu biosyntezy kolagenu: (i) poprzez ekspresję odpowiednich genów z grupy *COL* oraz (ii) pobudzenie aktywności prolidazy, enzymu katalizującego ostatni etap odzyskiwana proliny stanowiącej budulec kolagenu. Doktorantka omówiła także złożone zjawisko apoptozy, czyli fizjologicznie zaprogramowanej śmierci komórki regulowanej przez odpowiednie szlaki zewnętrzne i wewnętrzne. W ostatnim podrozdziale przedstawiła metaboliczne konsekwencje zatrucia alkoholem uzasadniające wybór tego związku jako kluczowej substancji użytej do badań.

Kwas hialuronowy stosowany jest w coraz szerszym zakresie z uwagi na jego zdolność wpływania na procesy biosyntezy i degradacji kolagenu. Jednak mimo postępu wiedzy nadal nie można mówić o przełomie w leczeniu chorób związanych z zaburzeniami syntezy kolagenu w tkance łącznej, bowiem wiele mechanizmów jego działania nie zostało jeszcze poznanych.

Wybór tematu pracy jest zatem jak najbardziej trafny i ważny. Celem badań Doktorantki była ocena w fibroblastach skóry ludzkiej poddanych działaniu różnych stężeń etanolu oraz w obecności lub bez kwasu hialuronowego mechanizmów zaburzeń metabolizmu kolagenu w zakresie:

- biosyntezy i degradacji białka,
- aktywności prolidazy,
- ekspresji receptora β_1 integrynowego i receptora insulinopodobnego czynnika wzrostu,
- ekspresji białek szlaku sygnałowego i czynników transkrypcyjnych,
- oraz apoptozy

2. Poprawność metodyczna

2.1 Materiał i metody

Doktorantka w 14 punktach wymieniła listę materiałów, a w kolejnych 12 punktach opisała dokładnie metody, które zastosowała podczas przeprowadzania zaplanowanych eksperymentów. Na końcu omówiła metody analizy statystycznej.

Do eksperymentów używane były fibroblasty skóry ludzkiej zakupione w banku komórek *American Type Culture Collection* (ATCC), które Doktorantka traktowała etanolem (w rosnących stężeniach) oraz wodoronadtlenkiem tert-butylu (modelowy związek w badaniach stresu oksydacyjnego) w obecności lub bez kwasu hialuronowego (HA). W kolejnych etapach eksperymentu oceniała wpływ tych substancji na przeżywalność komórek, biosyntezę kolagenu oraz aktywność prolidazy w fibroblastach skóry ludzkiej, przedstawiając odpowiednio wykorzystane metody i testy.

Ekspresję białek szlaku sygnałowego, tj. receptora $\beta 1$ integrynowego oraz receptora insulinopodobnego czynnika wzrostu I (IGF-1R), białka FAK i Akt, kinaz MAPK (ERK_{1/2}) oraz czynnika transkrypcyjnego NF κ B w badanych fibroblastach oceniała metodą Western blot.

Do pomiaru biosyntezy DNA w badanych komórkach poddanych działaniu użytych substancji wykorzystwała metodą rediometryczną (pomiar wbudowanej [3H]-tymidyny), a aktywność żelatolityczną komórek badała metodą zymografii.

Podsumowanie: Stwierdzam, że przedstawiona i zastosowana metodyka badań spełnia kryteria dobrej praktyki laboratoryjnej. Doktorantka wykazała się wysokimi umiejętnościami wykorzystania różnorodnych technik w pracy laboratoryjnej realizując zadania zgodnie z założeniami.

2.2 Wyniki

Wyniki badań zostały zaprezentowane w logicznej chronologii i zilustrowane 14 znakomitymi rycinami, które zostały wyczerpująco opisane.

Doktorantka wykazała, że kwas hialuronowy działa ochronnie neutralizując powodowane przez etanol i wodoronadtlenek tert-butylu (tBHP) zaburzenia procesu biosyntezy kolagenu, hamowanie biosyntezy DNA i aktywowanie procesu apoptozy w fibroblastach skóry ludzkiej. Obniżenie cytotoksycznego działania etanolu na komórki skóry ludzkiej (*epidermoid skin cells*) poprzez dodanie w odpowiednich stężeniach kwasu hialuronowego opisali wcześniej Neuman et al. [2011].

Uzyskane wyniki pozwoliły Doktorantce na stwierdzenie, że etanol, proporcjonalnie do wzrostu stężenia, powoduje zaburzenie ekspresji receptora $\beta 1$ integrynowego oraz receptora IGF-1R skutkujące zaburzeniem ekspresji kinazy FAK, co potwierdzone zostało w mikroskopie konfokalnym, w konsekwencji hamuje biosyntezę kolagenu.

Autorka wykazała, że na obniżenie biosyntezy kolagenu ma także wpływ obniżenie aktywności prolidazy, enzymu, którego aktywność kontrolowana jest przez receptor $\beta 1$ integrynowy oraz receptor IGF-1. Ponadto, z badań wynika, że na obniżenie aktywności prolidazy dodatkowy wpływ ma prawdopodobnie wzrost ekspresji czynnika transkrypcyjnego NF κ B korelujący ze wzrastającymi stężeniami etanolu i BHP.

Interesujące są wyniki oceny szlaku sygnałowego regulowanego przez kaskadę kinaz MAP (ERK_{1/2}), który powiązany jest z ekspresją, m.in., receptora β 1 integrynowego oraz IGF-1R. Badania Doktorantki wskazują na znaczący wpływ etanolu oraz tBHP na obniżenie ekspresji receptora β 1 integrynowego oraz IGF-1R i, w konsekwencji, także na obniżenie ekspresji fosforylowanych form kinaz MAPK.

Kolejnym ważnym wykładnikiem zaburzeń wywoływanych przez działanie etanolu i tBHP w fibroblastach skóry ludzkiej w hodowli *in vitro* jest dynamika biosyntezy DNA oraz apoptozy. Autorka wykazała, proporcjonalne do stężenia stosowanych preparatów, obniżenie zarówno syntezy DNA, jak i przeżywalności komórek. Ocenę ilościową komórek apoptotycznych przy użyciu NucleoCounter NC-3000TM uzupełniła oceną ekspresji kaspazy 9, pełniącej rolę inicjującą działanie kaspaz wykonawczych (3, 6 i 7), wykazując wzrost jej aktywności proporcjonalny do stężeń etanolu.

Jak wspomniałam wcześniej doktorantka wykazała protekcyjne, wielokierunkowe działanie kwasu hialuronowego na cytotoksyczne działanie badanych substancji.

Podsumowanie: Wyniki starannie zaplanowanych i przeprowadzonych eksperymentów dostarczają ważnych informacji uwzględniających różne aspekty procesów metabolicznych związanych z cytotoksycznym wpływem różnych stężeń etanolu na fibroblasty w hodowli *in vitro* oraz dokumentują ochronne działanie kwasu hialuronowego na badane komórki.

3. Wartość naukowa wniosków wynikających z przeprowadzonych analiz.

Doktorantka w pełni osiągnęła założone cele, które pozwoliły na prawidłowe sformułowanie 5 wniosków. Zastanawiam się jedynie, czy uwzględniając we wnioskach zarówno wpływ etanolu (stosowanego w różnych stężeniach), jak i wodoronadtlenku tert-butyłu (tBHP) na badane procesy metaboliczne, nie należało uwzględnić tego drugiego związku w tytule pracy.

Podsumowanie: Wyniki uzyskane w trakcie realizacji projektu stanowią istotny wkład Autorki w poznawanie skomplikowanej natury mechanizmów związanych z protekcyjnym działaniem kwasu hialuronowego obniżającym cytotoksyczny wpływ etanolu i wodoronadtlenku tert-butyłu *in vitro* w badanych fibroblastach ludzkich. Efekty przeprowadzonych badań zasługują na opublikowanie w czasopiśmie anglojęzycznym. Doktorantka ma już na tym polu pewne doświadczenie, ponieważ w 2014 roku opublikowała pracę w *Drug Design, Development and Therapy* (5-letni wskaźnik IF=3,033). Niewątpliwie będą także inspiracją do dalszych badań naukowych zmierzających do pogłębienia wiedzy na temat mechanizmów związanych z ochronnym działaniem kwasu hialuronowego.

4. Redakcja przedłożonej pracy

Wykorzystane w prezentacji wyników liczne i bardzo dobrej jakości ryciny stanowiące element spójnej dokumentacji naukowo-badawczej znakomicie ułatwiają śledzenie opisów tekstowych. Zabrakło mi jedynie odrębnego sformułowania hipotezy „0”.

Nie mam merytorycznych zastrzeżeń do recenzowanej pracy, a jedynie kilka uwag o charakterze redakcyjnym:

WSTĘP

- Str. 17, akapit 2 i 3: określenie „... chorób artretycznych ...” lepiej zastąpić polskim terminem: „chorób zwyrodnieniowych stawów”. Słowa artretyzm używa się raczej w języku potocznym, nierzadko jako równoznaczne z określeniami ‘dna’, ‘podagra’ lub ‘skaza moczanowa’.
- Str. 17, akapit 3 – zgubienie litery „k” spowodowało zmianę z „wielkocząsteczkowy” na „wielocząsteczkowy” kwas hialuronowy.
- Str. 17, akapit 4 – określenie „katarakta” lepiej zastąpić bardziej precyzyjnym fachowym terminem „zaćma”.
- Str. 22, akapit 3: zamieszanie w terminologii kinaz MAK – do korekty.
- Str. 25, akapit 2: utrata sylaby „dy” w nazwie „fosfaty(dy)loinozytolu”

METODY

- Str. 37, 2.1 Przygotowanie hodowli fibroblastów skóry ludzkiej
Skrót od: *American Type Culture Collection* to ATCC, a nie ATTC.

WYNIKI

- Str. 69, akapit 3.: w zdaniu „Kolejno przy stężeniach ... biosynteza ...” brak orzeczenia.

LITERATURA

- Poz. 160 – monografia, brak roku wydania,
- Poz. 168 – artykuł – brak nazwy czasopisma.

Podsumowanie: Powyższe uwagi nie obniżają wartości i nie powinny wpłynąć na ogólną ocenę pracy, która, co chcę podkreślić, została napisana dobrą polszczyzną i starannie zredagowana. Nie wiem, czy w jakikolwiek sposób pomogą one Doktorantce w przygotowaniu ostatecznej wersji pracy do druku, ponieważ uważam, że publikacja powinna być napisana w języku angielskim, bo uzyskane wyniki zasługują na zaprezentowanie ich w piśmiennictwie o szerszym zasięgu.

WNIOSKI KOŃCOWE

Uwzględniając w ocenie merytoryczną i poznawczą wartość pracy w wymiarze naukowym oraz staranne przygotowanie jej pod względem redakcyjnym uważam, że w pełni spełnia ona wymagania określone Ustawą o Tytule Naukowym i Stopniach Naukowych.

Warto podkreślić wysokie umiejętności Doktorantki zarówno w zakresie pracy laboratoryjnej, krytycznej oceny uzyskanych wyników, przedstawienia ich w odpowiedniej formie i przeprowadzenia dyskusji z wykorzystaniem odpowiedniego piśmiennictwa.

Na tej podstawie zwracam się do Wysokiej Rady Naukowej Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem medycyny Laboratoryjnej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku z wnioskiem o dopuszczenie mgr Magdaleny Donejko do dalszych etapów przewodu doktorskiego.


Prof. dr hab. n. med. Krystyna H. Chrzanowska

Warszawa, 22 listopada 2015 r.