

dr hab. Małgorzata Przybyło
Zakład Biochemii Glikokoniugatów
Katedra Fizjologii Zwierząt
Instytut Zoologii
Uniwersytet Jagielloński
ul. Gronostajowa 9, 30-387 Kraków
☎ 12 664 64 62
e-mail: malgorzata.przybylo@uj.edu.pl



UNIWERSYTET
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

Ocena rozprawy doktorskiej
Pani lek. dent. Agnieszki Kossakowskiej
pod tytułem
„Aktywność egzoglikozydaz lizosomalnych
gruczołów ślinowych
w przebiegu eksperymentalnie indukowanej
cukrzycy typu 1”

Wydział

Biologii i Nauk o Ziemi

Instytut Zoologii

Katedra Fizjologii Zwierząt

Zakład Biochemii

Glikokoniugatów

Ze względu na skalę zjawiska, cukrzyca jest obecnie istotnym problemem zarówno współczesnej medycyny, jak i niemałym problemem społecznym i ekonomicznym. Dynamika wzrostu zachorowań na cukrzycę jest ogromna. W 1995 roku cukrzyca była diagnozowana na świecie u około 135 mln osób, w 2013 roku – już u około 382 mln, a szacuje się, że w 2035 roku dotknie ona prawie 592 mln osób. Z tej liczby u 85-95% chorych stwierdza się cukrzycę typu 2, za której główną przyczynę uznawane są zmiany stylu życia związane z postępowaniem ekonomicznym i urbanizacją, wraz z towarzyszącym temu brakiem aktywności fizycznej i wzrostem otyłości w populacji ogólnej. Na cukrzycę typu 1, będącą przedmiotem badań w niniejszej rozprawie doktorskiej, choruje na świecie ponad 30 mln osób, z czego w Polsce – około 200 tys. osób. Cukrzyca typu 1 uznawana jest za chorobę o podłożu autoimmunologicznym, a postępująca destrukcja komórek beta wysp Langerhansa trzustki przy 80-90% spadku ich liczebności prowadzi do bezwzględnej niedoboru insuliny u chorych, w następstwie czego dochodzi do hiperglikemii i załamania metabolizmu organizmu. Procesy autoimmunologiczne przebiegające u chorych na cukrzycę typu 1 mogą obejmować również inne narządy, co w rezultacie może

ul. Gronostajowa 9

30-387 Kraków

tel. 12 664 64 68

12 664 64 65

fax 12 664 51 01



UNIWERSYTET
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

doprowadzić do współistnienia z innymi chorobami takimi jak: niedoczynność tarczycy typu Hashimoto, bielactwo, celiakia, reumatoidalne zapalenie stawów, łysienie plackowate, wrzodziejące zapalenie jelit, pierwotna niedoczynność kory nadnerczy (choroba Addisona) czy niedokrwistość Addisona-Biermera. Dodatkowo u chorych na cukrzycę typu 1 istotnie częściej niż u osób zdrowych występują osteopenia, osteoporoza i złamania kości. Pomimo, że zapadalność na cukrzycę typu 1 zwiększa się z każdym rokiem, nie wyjaśniono dokładnie etiopatogenezy jej rozwoju. Wśród głównych przyczyn odpowiedzialnych za wywołanie cukrzycy typu 1 u osób predysponowanych genetycznie wymienia się infekcje wirusowe, stres, dietę, niedobór witaminy D₃ i ekspozycję środowiskową.

Wydział

Biologii i Nauk o Ziemi

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pani lek. dent. Agnieszki Kossakowskiej ma typowy układ dla tego rodzaju prac. Rozdział *Wstęp* zajmuje 33 strony, rozdział *Materiały i metody* – 14 stron, rozdział *Wyniki* – 36 stron, rozdział *Dyskusja* – 11 stron. *Bibliografia* obejmuje 164 pozycje literaturowe, z czego 99 prac zostało opublikowanych w ciągu ostatnich 10 lat, 52 prace w ciągu ostatnich 5 lat, a najstarsza z cytowanych prac została wydana w 1961 roku. Poza wymienionymi kluczowymi rozdziałami Autorka umieściła w rozprawie doktorskiej dodatkowo: *Wykaz skrótów*, *Cele pracy*, *Wnioski*, *Streszczenia* pracy w języku polskim i angielskim, *Spis rycin* i *Spis tabel*. Cała praca zajmuje 146 stron, a ilustrowana jest 14 rycinami i 30 tabelami.

Instytut Zoologii

Katedra Fizjologii Zwierząt

Zakład Biochemii

Glikokoniugatów

We *Wstępie* podzielonym na cztery rozdziały (*Insulina*, *Cukrzyca typu 1*, *Gruzoły ślinowe szczura*, *Glikokoniugaty*) opisano topografię, morfogenezę, morfologię, unaczynienie i unerwienie gruczołów ślinowych szczura, budowę i syntezę insuliny, strukturę jej receptora i aktywowane przy jego udziale szlaki sygnałowe, efekty wywoływane przez insulinę w tkankach docelowych, etiopatogenezę cukrzycy typu 1, zmiany zachodzące w śliniankach pod wpływem cukrzycy typu 1. Ponadto przedstawiono charakterystykę amylazy ślinowej uważanej za marker prawidłowego funkcjonowania gruczołów ślinowych, budowę glikokoniugatów macierzy pozakomórkowej oraz opisano enzymy odpowiedzialne za ich katabolizm. Do tej części rozprawy mam następujące uwagi:

1. Na stronie 11 napisano, że masa cząsteczkowa insuliny wynosi 5734 Da. To prawda, ale tylko w odniesieniu do insuliny wołowej. Masa cząsteczkowa insuliny ludzkiej to 5808 Da, a wieprzowej – 5778. Z tego właśnie powodu gdy nie jest podane źródło pochodzenia insuliny, jak

ul. Gronostajowa 9

30-387 Kraków

tel. 12 664 64 68

12 664 64 65

fax 12 664 51 01



UNIwersytet
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

- w tym przypadku, zwykle podaje się, że masa cząsteczkowa insuliny wynosi około 6000 Da.
2. Preproinsulina kierowana jest do wnętrza cystern szorstkiego retikulum endoplazmatycznego, a nie „do środka pęcherzyka retikulum endoplazmatycznego” (str. 12).
 3. Białka IRS nie są „fizjologicznym celem aktywowanej kinazy IR” (str. 13), ale jej substratem.
 4. Transportery glukozy nie „przenikają błony komórkowej 12 spiralnymi lukami” (str. 13), ale posiadają 12 transbłonowych segmentów.
 5. Pisząc o amylazach Doktorantka zapomina, że enzymy są czynnikami katalizującymi zajście danej reakcji, ale jej nie wykonują, czyli np. nie hydrolizują (str. 29 i następne). Zatem powinno być napisane, że amylazy katalizują zajście procesu hydrolizy określonego wiązania glikozydowego. O ile opisy w tekście są niepoprawne, to legendy do Rycin 9-12 już tak.
 6. Amylazy nie różnią się pod względem „rodzaju katalizowanych wiązań” (str. 29), ale specyfiką substratową, a różnice między izoenzymami nie wynikają z „ich właściwości hydrolitycznych” (str. 29), ale ze specyfiki substratowej czy ewentualnie powinowactwa do substratu.
 7. Co to są „ α -glikany” (str. 29)? Nie jest to termin spotykany w literaturze glikobiologicznej. Czy to określenie nie zostało zaczerpnięte z pracy autorstwa Urszuli Kaczmarek i Moniki Mysiak-Dębskiej „Aktywność α -amylazy w ślinie u dzieci chorych na cukrzycę” Dent. Med. Probl. (2005) 42: 449-456?
 8. Nie mogę zgodzić się ze stwierdzeniem, że wiązanie O-glikozydowe ma „budowę” (str. 32). Wiązanie O-glikozydowe to rodzaj wiązania glikozydowego łączącego grupę hydroksylową pierścieniowej formy cukru z grupą hydroksylową innego związku. W przypadku O-glikanów podział, na który powołuje się Doktorantka za podręcznikiem autorstwa Iwony Żak „Chemia medyczna”, dotyczy jedynie rodzaju cukru, który bierze udział w tworzeniu wiązania O-glikozydowego (α -GalNAc, β -D-Xyl, β -D-Gal) a nie różnic w budowie wiązania O-glikozydowego.
 9. Przy opisywaniu budowy siarczanu dermatanu i chondroityny powinno być wspomniane, że reszty N-acetylogalaktozamin są siarkowane (str. 34).

Wydział

Biologii i Nauk o Ziemi

Instytut Zoologii

Katedra Fizjologii Zwierząt

Zakład Biochemii

Glikokoniugatów

ul. Gronostajowa 9

30-387 Kraków

tel. 12 664 64 68

12 664 64 65

fax 12 664 51 01



UNIwersytet
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

10. W siarczanie dermatanu N-acetylogalaktozoamina i kwas L-iduronowy połączone są wiązaniem β 1,3 glikozydowym a nie α 1,3 glikozydowym (str. 34).
11. Stwierdzenie „kwas hialuronowy jako jedyny nie łączy się z białkiem” (str. 34) jest niepełne. Chodzi bowiem o to, że w odróżnieniu od innych typów glikanów nie tworzy on kowalencyjnych połączeń z białkami, ale może z tymi cząsteczkami oddziaływać w sposób niekowalencyjny.
12. Na Rycinie 6 przedstawiono nie budowę N-glikoprotein, ale typy N-glikanów.
13. Słowo „centryczny” wg Słownika języka polskiego PWN oznacza „skierowany ku jednemu punktowi”. Zatem zgodnie z tą definicją w rozprawie powinno być napisane, że endoglikozydazy katalizują hydrolizę określonych wiązań glikozydowych położonych wewnątrz łańcucha, a nie centrycznie (str. 37) w łańcuchu sacharydowym.
14. Przy opisie budowy białek lepiej jest używać określenia „zbudowane jest z łańcuchów/podjednostek” niż „składa się” czy „utworzone jest z” (str. 40).
15. Opisane w pracy enzymy lizosomalne nie katalizują hydrolizy monosacharydów (np. GlcNAc str. 39; Gal str. 42, 43; Fuc str. 45), ale hydrolizę ściśle określonego wiązania glikozydowego.

Wydział

Biologii i Nauk o Ziemi

Instytut Zoologii

Katedra Fizjologii Zwierząt

Zakład Biochemii

Glikokoniugatów

Cele pracy zostały jasno określone. Pani lek. dent. Agnieszka Kossakowska postanowiła zbadać czy funkcje wydzielnicze oraz aktywność właściwa egzoglikozydaz lizosomalnych zależą od rodzaju gruczołu ślinowego, jak wiek szczura wpływa na te parametry, czy indukowana streptozotocyną cukrzyca typu 1 wpływa na funkcje wydzielnicze gruczołów ślinowych i aktywność właściwą wspomnianej grupy enzymów, oraz czy okres trwania cukrzycy jest czynnikiem dodatkowo modulującym te parametry.

W rozdziale *Materiały i metody* nie wszystkie faktycznie funkcjonujące w rozprawie doktorskiej podrozdziały mają swoją numerację, co znacznie utrudnia szybkie odnalezienie niezbędnych informacji dotyczących stosowanych metod badawczych w tekście. Opisane metody badawcze zarówno w odniesieniu do sposobu indukcji cukrzycy typu 1 u szczurów, pozyskiwania materiału badawczego, oznaczania stężenia białka czy aktywności specyficznej wybranych enzymów lizosomalnych są powszechnie stosowane w tego typu badaniach i w większości przypadków dokładność ich opisu (procedury wykonania)

ul. Gronostajowa 9

30-387 Kraków

tel. 12 664 64 68

12 664 64 65

fax 12 664 51 01

pozwalalaby na powtórzenie badań. Ale po lekturze tej części rozprawy nasunęły mi się następujące uwagi:



UNIWERSYTET
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

1. Zwyczajowo w rozprawach doktorskich przygotowuje się kompletny spis obejmujący wszystkie odczynniki wykorzystywane podczas wykonywania pracy badawczej wraz ze wskazaniem źródeł ich pochodzenia. W recenzowanej pracy te informacje są częściowo zebrane na stronach 50-51, a reszta umieszczona jest przy opisie stosowanych metod. Powinno to raczej znajdować się w jednym miejscu (spis odczynników). Poza tym dane dotyczące wykorzystywanego sprzętu sugerowałabym umieszczać jednak przy opisie metod.
2. Kim jest doświadczony operator (MK) o którym jest mowa na str. 53?
3. Jakie jest stężenie roztworu KCl zawierającego 0,2% Triton X-100 (str. 53)? Jest to roztwór 0,15-molowy czy 0,15-milimolowy jak wynikałoby z opisu jego wykonania?
4. Zawartość białka odczytuje się z krzywej kalibracyjnej a nie wykresu kalibracyjnego (str. 56).
5. Czy sprawdzono, że zamiana 0,1 M buforu fosforanowo-cytrynianowego o pH 4,7 na 0,1 M bufor octanowy o pH 4,5 nie wpływa na wartość mierzonej absorbancji uwolnionego p-nitrofenolu w takim środowisku przy oznaczaniu aktywności β -glukuronidazy?
6. Przy opisie roztworów substratów enzymów lizosomalnych (str. 57) powinny podane być ich stężenia molowe. wtedy nie trzeba by było szukać tych informacji na str. 59-61.
7. Detaliczny opis wykonania odczynników (buforów i substratów) moim zdaniem jest zbędny. Skład jakościowy i ilościowy zawiera wszystkie niezbędne informacje do ich przygotowania w laboratorium.
8. Nieprawidłowo przedstawiony jest zakres współczynnika korelacji r dla nikłej korelacji (str. 63). Powinno być $0 < r < 0,1$. Poza tym skala współczynnika korelacji (r) powinna dotyczyć bezwzględnej wartości z parametru r , a nie samego r , gdyż parametr ten może przyjmować wartości od -1 do 1.

Wydział

Biologii i Nauk o Ziemi

Instytut Zoologii

Katedra Fizjologii Zwierząt

Zakład Biochemii

Glikokoniuatów

ul. Gronostajowa 9

30-387 Kraków

tel. 12 664 64 68

12 664 64 65

fax 12 664 51 01

Otrzymane wyniki będące rezultatem przeprowadzonych badań zostały udokumentowane w 28 tabelach, a ich opis w sekcji *Wyniki* jest dosyć lakoniczny. Przeprowadzone badania uprawniały Doktorantkę do wyciągnięcia następujących wniosków: ani wiek szczurów ani rodzaj badanego gruczołu ślinowego nie ma



UNIwersytet
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

wpływu na aktywność właściwą wybranych egzoglikozydaz lizosomalnych, skutkiem cukrzycy typu 1 są zaburzenia funkcjonowania ślinianek przyusznych manifestujące się spadkiem całkowitej zawartości białka i aktywności właściwej amylazy ślinowej oraz zmianami aktywności właściwej większości badanych enzymów, na co ma wpływ dodatkowo czas trwania choroby. Zatem wytyczone cele zostały zrealizowane i wnoszą nowe informacje dla tej dziedziny wiedzy. W większości badań prowadzących do wyjaśniania mechanizmów leżących u podstaw rozwoju różnych schorzeń u ludzi stosuje się modele zwierzęce. Niestety modele te choć zapewniają nieocenioną pomoc, nie uprawniają do ich bezpośredniego przełożenia na ludzi. Niemniej jednak otrzymane wyniki pomogą zrozumieć mechanizmy prowadzące do dysfunkcji gruczołów ślinowych i obserwowanych zmian patologicznych w jamie ustnej u chorych z cukrzycą typu 1 wnosząc zupełnie nowe elementy poszerzające istniejący stan wiedzy i podkreślające zasadność kontynuacji tego typu badań w przyszłości.

Wydział

Biologii i Nauk o Ziemi

Instytut Zoologii

Zdecydowanie najbardziej wartościową część rozprawy doktorskiej Pani lek. dent. Agnieszki Kossakowskiej stanowi *Dyskusja*. Nie jest ona może zbyt rozbudowana objętościowo, ale wynika to głównie z niezbyt obszernego piśmiennictwa poświęconego temu zagadnieniu. Omówienie wyników i rzeczowa dyskusja są wyczerpujące, logiczne, a nowe fakty wyjaśnione w przejrzysty sposób. Wskazuje to na dobrą znajomość literatury przedmiotu, a ponadto dowodzi dojrzałości naukowej doktorantki. Rozprawa doktorska Pani lek. dent. Agnieszki Kossakowskiej powstała w jednym z nielicznych krajowych ośrodków naukowych zajmujących się badaniem roli enzymów lizosomalnych w patologii różnych chorób, co też znalazło odzwierciedlenie w *Dyskusji* wyników i odwoływaniu się do otrzymanych przez Zespół rezultatów. Z tego powodu właśnie brakuje mi w *Dyskusji* odwołania się i skomentowała przez Doktorantkę swoich wyników dotyczących zmian aktywności właściwej egzoglikozydaz lizosomalnych w gruczołach ślinowych szczura w przebiegu eksperymentalnie indukowanej cukrzycy typu 1 w kontekście zmian obserwowanych w eksperymentalnie indukowanej insulinooporności (Julita Sokołowska *Antyoksydanty i egzoglikozydazy lizosomalne gruczołów ślinowych w przebiegu eksperymentalnie indukowanej insulinooporności*, rozprawa doktorska, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku, 2015).

Katedra Fizjologii Zwierząt

Zakład Biochemii

Glikokoniugatów

ul. Gronostajowa 9

30-387 Kraków

tel. 12 664 64 68

12 664 64 65

fax 12 664 51 01

Rozprawa doktorska jest starannie przygotowana pod względem redakcyjnym. Nie mam większych zastrzeżeń co do układu pracy, poprawności formalnej manuskryptu (zgodności cytowań z listą literatury, opracowania bibliografii



UNIwersytet
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

według przyjętej konwencji, zachowania marginesów, interlinii i wielkości czcionki), jakości tabel czy większości rycin, chociaż informacje umieszczone na *Rycinach* 1 i 2 powinny być napisane większą czcionką. Ale jak to zwykle bywa przy tak objętościowo obszernych pracach, wszystkich błędów redakcyjnych nie da się uniknąć. Zatem jeszcze na koniec uwagi natury edycyjnej:

1. W rozprawie doktorskiej są liczne, typowa też prac dyplomowych, błędy polegające na „sklejaniu” wartości liczbowych z jednostkami.
2. *Spis Treści*: rozdział 9. *Dyskusja* zaczyna się na stronie 101 a nie 100, rozdział 13. *Summary* - na stronie 135 a nie 134.
3. Dalton to uniwersalna jednostka masy definiowana jako 1/12 masy atomu ^{12}C , a nie „jednostka masy cząsteczki białka” (str. 8).
4. W przypadku białek stosuje się pojęcie masa cząsteczkowa a nie „masa cząsteczki” (str. 8).
5. Preferencyjnie stosowane rozwinięcie skrótu TNF α to czynnik martwicy nowotworu, a nie „czynnik martwicy guza” (str. 9).
6. Zwyczajowo nazwy genów pisane są kursywą.
7. W rozprawie są liczne niezręczności stylistyczne: np. „punktem wyjścia do powstania insuliny” (str. 12) – raczej syntezy; „domena wewnątrzcytoplazmatyczna” (str. 13) zamiast domena cytoplazmatyczna; „siarczan chondroityny zbudowany jest z N-acetylogalaktozamininy i kwasu D-glukuronowego połączonych za pomocą wiązań β 1,3 glikozydowych” (str. 34) zamiast połączonych wiązaniem β 1,3 glikozydowym; „genetycznie uwarunkowana wadliwa podjednostka” lub „defekt podjednostki” (str. 40) zamiast modyfikacje genetyczne podjednostki; „lodowato zimny” (str. 53) zamiast lodowaty; ślinianki „pofragmentowano nożyczkami chirurgicznymi” (str. 53) zamiast pocięto na małe kawałki; zlewkę trzymano „w łaźni lodowej” (str. 53) zamiast na lodzie; „w potrójnych próbach” (str. 54) zamiast w trzech powtórzeniach.

Wydział

Biologii i Nauk o Ziemi

Instytut Zoologii

Katedra Fizjologii Zwierząt

Zakład Biochemii

Glikokoniugatów

Pomimo przedstawionych powyżej krytycznych uwag, moja ocena rozprawy doktorskiej jest pozytywna. Rozprawa ta wnosi do nauki nowe informacje na temat wpływu cukrzycy typu 1 na funkcjonowanie gruczołów ślinowych szczurów, a w szczególności aktywność właściwą wybranych enzymów lizosomalnych. Biorąc pod uwagę wszystkie elementy przeprowadzonej oceny mogę z całą odpowiedzialnością stwierdzić, że rozprawa doktorska Pani lek. dent.

ul. Gronostajowa 9

30-387 Kraków

tel. 12 664 64 68

12 664 64 65

fax 12 664 51 01

Agnieszki Kossakowskiej pod tytułem „*Aktywność egzoglikozydaz lizosomalnych gruczołów ślinowych w przebiegu eksperymentalnie indukowanej cukrzycy typu I*” spełnia wymogi formalne stawiane kandydatom do uzyskania stopnia doktora i 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. nr 65, poz. 595) oraz w Rozporządzeniu Ministra Edukacji Narodowej i Sportu z dnia 15 stycznia 2004 roku, i zwracam się z wnioskiem do Rady Wydziału Lekarskiego z Oddziałem Stomatologii i Oddziałem Nauczania w Języku Angielskim Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku o dopuszczenie Pani lek. dent. Agnieszki Kossakowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



UNIWERSYTET
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

Wydział

Biologii i Nauk o Ziemi

Instytut Zoologii

Katedra Fizjologii Zwierząt

Zakład Biochemii

Glikokoniugatów

Kraków, dnia 25. lutego 2016 roku.

ul. Gronostajowa 9

30-387 Kraków

tel. 12 664 64 68

12 664 64 65

fax 12 664 51 01