GDAŃSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY

WYDZIAŁ LEKARSKI
KATEDRA BIOCHEMII KLINICZNEJ
ZAKŁAD MEDYCYNY MOLEKULARNEJ
80-211 Gdańsk, ul. Dębinki 7, paw. 27
tel. 058 349 27 59, fax: 058 349 27 97
e-mail: medmol@gumed.edu.pl

Gdańsk, 14.11.2018

Dr hab. Monika Sakowicz-Burkiewicz, prof. nadzw. GUMed
Zakład Medycyny Molekularnej
Katedra Biochemii Klinicznej
Gdański Uniwersytet Medyczny
ul. Dębinki 7, bud. 27, 80-211 Gdańsk
tel. 58 349-27-59
e-mail: monika.sakowicz-burkiewicz@gumed.edu.pl

Recenzja rozprawy doktorskiej

lek. stom. PIOTRA ŻUKOWSKIEGO
pt.: "Wpływ suplementacji N-acetylocysteiny na stres oksydacyjny w gruczołach ślinowych w szczurzym modelu insulinooporności"

Jednymi z najpoważniejszych problemów zdrowotnych, z jakimi boryka się ludzkość w XXI wieku są cukrzyca i otyłość. Powszechnie wiadomo, że około 90% przypadków cukrzycy na świecie stanowi cukrzyca typu 2, która rozwija się wolno, często towarzyszy jej nadmierna masa ciała, mała aktywność fizyczna i nadmierne spożycie kalorii, zwłaszcza cukrów prostych. Szacunkowe dane WHO wskazują, że na świecie na cukrzycę typu 2 choruje ponad 200 milionów ludzi, a do roku 2030 liczba ta ulegnie podwojeniu. W dzisiejszych czasach śmiertelność spowodowana chorobami będącymi następstwami cukrzycy typu 2 stanowi ponad 5% wszystkich przyczyn zgonów na świecie.

Wyróżnia się dwie przyczyny cukrzycy typu 2: upośledzenie wydzielania insuliny, na które wpływ mają różne czynniki genetyczne i oporność na działanie insuliny (insulinooporność), której przyczyną mogą być zarówno czynniki genetyczne, jak i środowiskowe. Niewrażliwość tkanek docelowych na insulinę, głównie mięśni szkieletowych, tkanki tłuszczowej i wątroby, oznacza brak właściwej odpowiedzi organizmu na ten hormon. Zmniejszenie insulinowrażliwości można zaobserwować kilka do kilkunastu lat przed wystąpieniem jawnej cukrzycy. Jednym z mechanizmów powstawania insulinooporności może być stres oksydacyjny, czyli zaburzenie równowagi pomiędzy reakcjami prooksydacyjnymi i możliwościami obrony antyoksydacyjnej organizmu. Stres oksydacyjny w cukrzycy jest skutkiem występowania wysokich stężeń glukozy i kwasów tłuszczowych. Dodatkowo zagrożeniu oksydacyjnemu w cukrzycy towarzyszą zmiany

aktywności enzymów przeciwutleniających, głównie obniżenie ich aktywności. Antyoksydanty dostarczane do organizmu wraz z pożywieniem lub pod postacią suplementów mają działanie zarówno przeciwutleniające, jaki antydiabetyczne.

W ten nurt badań wpisuje się rozprawa doktorska lek. stom. Piotra Żukowskiego prezentująca wyniki badań nad wpływem N-acetylocysteiny (NAC) na stres oksydacyjny w gruczołach ślinowych w szczurzym modelu insulinooporności, zrealizowana w Zakładzie Stomatologii Zachowawczej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku pod kierunkiem Pani prof. dr hab. Danuty Waszkiel.

Temat wybrany przez doktoranta uważam za aktualny, ważny poznawczo i istotny praktycznie. Ślinianki są narządami wydzielania zewnętrznego produkującymi ślinę. Człowiek każdego dnia produkuje jej około 1-1,5 litra. Cukrzyca wywołuje niezapalne, nienowotworowe powiększenie ślinianek przyusznych, zmienia czynność gruczołów ślinowych (zmniejsza ilości wytwarzanej śliny) oraz zmiany ilościowe i jakościowe w jej składzie.

Cel rozprawy doktorskiej – ocena wpływu suplementacji NAC na parametry równowagi oksydacyjno-antyoksydacyjnej w osoczu oraz śliniankach przyusznych i podżuchwowych oraz funkcję wydzielniczą tych gruczołów u szczurów karmionych paszą bogatotłuszczową (60% zawartości tłuszczów), jest ambitny, a wyniki uzyskane mają znaczną wartość poznawczą dla patogenezy zmian występujących w śliniankach w związku z rozwojem insulinooporności i cukrzycą typu 2.

Przestawiona do oceny rozprawa doktorska składa się z dwóch publikacji opublikowanych w recenzowanych czasopismach naukowych o łącznym współczynniku wpływu - IF prawie 7,0, wstępu, krótkiego omówienia tych prac w języku polskim i streszczenia zarówno w języku polskim, jak i angielskim, oraz z wykazu piśmiennictwa. Zawiera również oświadczenia współautorów: pierwsza praca ma 3 autorów, a druga – 7 autorów. Udział doktoranta w prowadzonych badaniach i jego wkład w przygotowanie przedstawionych manuskryptów został jasno określony (odpowiednio 90 % i 70%). Pierwsza praca pt.: „*Sources of free radicals and oxidative stress in the oral cavity*" to klasyczna praca poglądowa opublikowana w impaktowanym czasopiśmie *Archives of Oral Biology* (IF=2,05) w 2018 roku, a doktorant jest zarówno pierwszym, jaki i korespondencyjnym autorem. W tej pracy doktorant przedstawił aktualny stan wiedzy na temat głównych źródeł reaktywnych form tlenu (ROS) i stresu oksydacyjnego w środowisku jamy ustnej. Jama ustna jest miejscem szczególnie podatnym na uszkodzenia oksydacyjne. Rozpoznanie egzogennych źródeł ROS i ograniczenie narażenia na czynniki generujące ROS może być jednym ze środków profilaktycznych zapobiegających chorobom jamy ustnej.

Druga praca pt.: „*Effect of N-acetylocysteine on antioxidant defense, oxidative modifiaction and salivary gland function in rat model of insulin resistance*" zawierająca wyniki badań eksperymentalnych, co stanowi trzon tej rozprawy doktorskiej, została

opublikowana w impaktowanym czasopiśmie *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* o IF 4,936. Doktorat też jest pierwszym autorem tego manuskryptu.

Prace oryginalne zostały poprzedzone odpowiednim wstępem oraz streszczeniem, co wprowadza w tematykę podjętych badań. Streszczenie jest napisane poprawnym językiem naukowym. We wstępie doktorant w sposób zwięzły i klarowny opisuje reaktywne formy tlenu i stres oksydacyjny, przedstawia markery stresu oksydacyjnego charakterystyczne dla peroksydacji lipidów, oksydacyjnej modyfikacji białek i oksydacyjnego uszkodzenia DNA. Doktorant także omawia egzogenne i endogenne antyoksydanty obecne w systemach biologicznych, które zapobiegają powstawaniu wolnych rodników, redukują już utworzone wolne rodniki oraz umożliwiają naprawę powstałych uszkodzeń wolnorodnikowych. Rozdział omówienie prac składających się na rozprawę doktorską zawiera uzasadnienie i cel badań, opis metod badawczych i otrzymanych wyników oraz wnioski.

Z obowiązku recenzenta muszę zaznaczyć, że Doktorant nie uniknął drobnych błędów językowych, nieścisłości merytorycznych i nomenklaturowych szczególnie we wstępie rozprawy doktorskiej. Na przykład, Doktorant napisał:
- „CuZnSOD (SOD1) – dysmutaza ponadtlenkowa zawierająca miedź", str.5 a powinno być zawierająca miedź i cynk;
- raz „katiorodniki" razem str. 9, a raz niepoprawnie oddzielnie „katio rodniki" str. 10;
-„ ferrylowy i nadferrylowy kompleks F^{2+} - O_2- Fe^{3+} str. 10, a powinno być Fe^{2+} - O_2- Fe^{3+};
- „izoenzymy SOD działają z podobną stałą szybkością 1.6 10^9 $M^{-1}s^{-1}$" str. 15, a powinno być 1.6 x 10^9 $M^{-1}s^{-1}$;
- „glutamylocysysteinyloglicyny" str. 16, a powinno być glutamylocysteinyloglicyny;
- „redukcja dwusiarczkowych wiązań", a powinno być redukcja disiarczkowych wiązań według obowiązującej nomenklatury chemicznej. Jednakże, nie wpływają one na ogólny poziom naukowy pracy.

Celem podjętych przez Doktoranta badań było ustalenie czy suplementacja NAC w szczurzym modelu insulinooporności wpływa na stres oksydacyjny w gruczołach ślinowych za pomocą:

1. oceny bariery antyoksydacyjnej gruczołów ślinowych zarówno przyusznych, jak i podżuchwowych poprzez pomiar aktywności dysmutazy ponadtlenkowej (SOD1), peroksydazy ślinowej (Px), katalazy (CAT), stężenia zredukowanego glutationu (GSH) i całkowitej zdolności antyoksydacyjnej (TAS)

2. pomiaru stężenia markerów stresu oksydacyjnego: adduktów 4-HNE z białkami (4-HNE), 8-hydroksy-D-guanozyny (8-OHdG), zaawansowanych produktów oksydacji białek (AOPP), końcowych produktów zaawansowanej glikacji (AGE) oraz oceny całkowitej zdolności oksydacyjnej (TOS) i indeksu stresu oksydacyjnego (OSI)

3. oceny funkcji wydzielniczej gruczołów ślinowych.

Insulinooporność w szczurzym modelu wywołano poprzez dietę bogatotłuszczową zawierającą 60% tłuszczów, która skutkowała istotnym wzrostem stężenia insuliny w surowicy i glukozy we krwi oraz wskaźnika HOMA-IR. Proszę, żeby Doktorant przedstawił również inny szczurzy model odzwierciedlający cukrzycę typu 2 u człowieka.

Ocena dynamiki zmian parametrów równowagi oksydacyjno-antyoksydacyjnej w osoczu oraz w gruczołach ślinowych, jak również ich funkcji wydzielniczej została przeprowadzona w czterech grupach doświadczalnych: dwie grupy szczurów karmionych paszą standardową z i bez dożołądkowej suplementacji NAC, oraz dwie grupy szczurów karmione paszą bogatotłuszczową z i bez dożołądkowej suplementacji NAC. Ponieważ stres oksydacyjny jest podłożem wielu zespołów chorobowych, obecnie jest dostępnych wiele biomarkerów uszkodzeń wywoływanych przez stres oksydacyjny, które mogą być wykorzystane do oceny jego poziomu *in vivo*. Stosowane od wielu lat markery uszkodzenia lipidów to: aldehyd dimalonowy (MDA), utlenione lipoproteiny o niskiej gęstości (LDL), przeciwciała utlenionych LDL, akroleina, F2-izoprostany, 4-hydroksynonenal (4-HNE). W niniejszej pracy skupiono się na ocenie peroksydacji lipidów na podstawie oznaczenia stężenia kompleksów 4-HNE z białkami. Chciałabym usłyszeć komentarz Doktoranta uzasadniający wybór oznaczania takiego markera peroksydacji lipidów.

Wyniki badań Doktoranta i współautorów potwierdziły, że insulinooporność indukowana dietą bogatotłuszczową zaburza systemy antyoksydacyjne ślinianek przyusznych, zmniejsza zarówno enzymatyczną, jak i nieenzymatyczną barierę antyoksydacyjną, co prowadzi do utlenienia kwasów nukleinowych, białek i lipidów. Ponadto Doktorant i współautorzy wykazali, ze suplementacja NAC tylko w gruczołach przyusznych wzmacnia mechanizmy enzymatycznej ochrony antyoksydacyjnej (SOD1, CAT, Px), a mechanizmy nieenzymatycznej ochrony wzmacnia zarówno w gruczołach przyusznych, jak i podżuchwowych. Zatem NAC zapobiega uszkodzeniu oksydacyjnemu ślinianek przyusznych, co nie doprowadza do redukcji śliny stymulowanej. Proszę Doktoranta o wyjaśnienie dlaczego oznaczano tylko aktywność SOD1 w osoczu i ekstraktach tkankowych, a nie np. całkowitą aktywność SOD oraz czy znany jest profil ekspresji genu *sod1* kodującego Cu,Zn-SOD, genu *sod2* kodującego Mn-SOD i genu *sod3* kodującego zewnątrzkomórkową EC-SOD w tkankach szczura, szczególnie w gruczołach ślinowych. U ssaków rodzina dysmutaz ponadtlenkowych (SOD, EC 1.15.1.1) obejmuje trzy różne izoenzymy: cytoplazmatyczny zwierający miedź i cynk (Cu,Zn-SOD), mitochondrialny zawierający mangan (Mn-SOD) i zewnątrzkomórkowy (extracellular, EC-SOD, również zawierający Cu i Zn,). Pomimo podobnych funkcji enzymy różnią się budową białka, lokalizacją chromosomową i strukturą genu, wymaganiami kofaktorów i umiejscowieniem w komórce.

Cykl publikacji jako rozprawa doktorska jest efektywnym dowodem przygotowania Doktoranta do dalszej samodzielnej pracy naukowej, jak również pozwala wierzyć

w dynamiczny Jego rozwój naukowy. Opublikowanie wyników swoich badań eksperymentalnych wymaga przejścia przez wszystkie etapy związane z pracą naukową: stworzenie koncepcji pracy, wykonanie części doświadczalnej i laboratoryjnej, opracowanie i interpretację wyników, napisanie i przygotowanie manuskryptu do druku, jak również ustosunkowanie się do uwag recenzentów, umiejętność współpracy z innymi badaczami (współautorstwo).

Na koniec pragnę podkreślić, że ogólna koncepcja rozprawy doktorskiej lek. stom. Piotra Żukowskiego jest dobrze przemyślana, bardzo logiczna i spójna. Cel badawczy został poprawnie sformułowany. Na podkreślenie zasługuje bogaty warsztat eksperymentalny, umiejętność analizy uzyskanych wyników oraz ich publikacja w renomowanych czasopismach naukowych. Uważam, że Doktorant osiągnął stawiane sobie cele. Wyniki badań eksperymentalnych pozwoliły na wyciągniecie wniosku sugerującego, że suplementacja N-acetylocysteiną w zwierzęcym modelu insulinooporności wzmacnia barierę antyoksydacyjną gruczołów ślinowych i zmniejsza stres oksydacyjny oraz zapobiega oksydacyjnemu uszkodzeniu gruczołów przyusznych, co nie doprowadza do redukcji śliny stymulowanej. Natomiast suplementacja NAC nie zapobiega spadkowi ilości białka w gruczołach ślinowych szczurów karmionych dietą bogatotłuszczową.

Podsumowując, przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska lek. stom. Piotra Żukowskiego pt.: "Wpływ suplementacji N-acetylocysteiny na stres oksydacyjny w gruczołach ślinowych w szczurzym modelu insulinooporności" będąca cyklem publikacji opublikowanych w renomowanych czasopismach o zasięgu międzynarodowym spełnia wymogi stawiane pracom doktorskim określone w Ustawie z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. z 2017 r. poz. 1789). Wnoszę zatem do Rady Wydziału Lekarskiego z Oddziałem Stomatologii i Oddziałem Nauczania w Języku Angielskim Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku o dopuszczenie lek. stom. Piotra Żukowskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie biorąc pod uwagę szeroki zakres metod badawczych, wartość naukową otrzymanych wyników oraz fakt, iż zostały one już opublikowane wnioskuję również o wyróżnienie rozprawy doktorskiej lek. stom. Piotra Żukowskiego.

Mikołowicz-Borkowska

14.11.18