Białystok, 25. 03. 2022 r.

dr hab. Adam Tylicki
Wydział Biologii, Katedra Mikrobiologii i Biotechnologii
Uniwersytet w Białymstoku
ul. Ciołkowskiego 1J
15-245 Białystok

Ocena rozprawy doktorskiej lek. med. Pauliny Sienickiej pt. „Wpływ N-acetylocysteiny na aktywność egzoglikozydaz lizosomalnych w soczewkach szczurów z insulinoopornością indukowaną dietą bogatotłuszczową"

wykonanej w Zakładzie Fizjologii i Zakładzie Stomatologii Zachowawczej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku oraz Katedrze Nauk Medycznych Państwowej Wyższej Szkoły Informatyki i Przedsiębiorczości w Łomży
pod kierunkiem dr hab. Sylwii Chojnowskiej

Cukrzyca jako jednostka chorobowa cieszy się niesłabnącym zainteresowaniem od zarania dziejów medycyny. Pierwsze teksty dotyczące cukrzycy odnajdziemy w literaturze starogreckiej z II w. naszej ery, a już w XI wieku objawy tej choroby zaczęły być opisywane w Kanonach Medycyny. Wielki postęp w metodach leczenia cukrzycy dokonał się w latach 20. XX wieku kiedy to zaczęto wykorzystywać insulinę w praktyce medycznej. Dzisiaj wiele czołowych laboratoriów, również w Polsce, prowadzi szerokie badania nad tzw. bioniczną trzustką, która ma zastąpić organ nie produkujący insuliny, co może być przełomem w leczeniu cukrzycy typu pierwszego. Śledząc literaturę fachową dotyczącą cukrzycy w bazie Web of Science znajdujemy ok. 400 tys. prac opublikowanych od 1900 roku do dziś. Przeszło 30 tys. publikacji ma w tytule słowo „zaćma", a jedynie około 1000 z nich ma w tytule „zaćmę cukrzycową". Stosunkowo niewielka liczba prac dotyczących zaćmy cukrzycowej może świadczyć o tym, że ta jednostka chorobowa nadal ma jeszcze wiele tajemnic. Powyższe spostrzeżenia ugruntowują mnie w przekonaniu, że badania dotyczące poznawania mechanizmów, diagnozowania i leczenia cukrzycy oraz jej powikłań są ze wszech miar ważnym trendem medycyny i nauk pokrewnych. Tym samym Doktorantka podejmując zagadnienia związane z etiopatologią cukrzycy i jej powikłań wpisuje się w tę jakże aktualną tematykę.

WPŁYNĘŁO DO DZIEKANATU
Wydziału Nauk o Zdrowiu
dnia 28.02.2022 J. Ambacher

Celem przedstawionej do oceny dysertacji jest oszacowanie wpływu N-acetylocysteiny (znanego i stosowanego w praktyce medycznej antyoksydantu) na katabolizm glikokoniugatów soczewki oka szczurów w warunkach indukowanej dietą insulinooporności. Zakładając możliwość oddziaływania glikokoniugatów na podwyższenie poziomu stresu oksydacyjnego i rozwój zaćmy, należy uznać, że postawiona hipoteza o protekcyjnym działaniu N-acetylocysteiny na soczewkę oka wynikającym z oczekiwanego obniżenia aktywności egzoglikozydaz lizosomalnych jest uzasadniona, a szczegółowe cele badań i dobrana metodyka pozwalają na jej weryfikację.

Pod względem edytorskim praca doktorska lek. med. Pauliny Sienickiej jest przygotowana bardzo starannie. Klarowny język fachowy nie jest przeładowany terminami, co ułatwia odbiór tekstu również fachowcom z dziedzin pokrewnych, takim jak ja. Odbiór pracy znacząco ułatwia również szczegółowy spis stosowanych skrótów. Oceniana rozprawa została spisana na ponad 150 stronach maszynopisu uzupełnionego dziewięcioma tabelami i około trzydziestoma rycinami odpowiednio opisanymi i cytowanymi w tekście, stanowiącymi dobre uzupełnienie treści. Dysertacja ma układ typowy dla prac eksperymentalnych, gdzie obszerny wstęp poprzedza hipotezę i szczegółowo postawione cele pracy. Wstęp zawiera informacje dotyczące anatomii i histologii oka, ze szczególnym uwzględnieniem soczewki, jak też zagadnienia związane z patogenezą i metodami leczenia zaćmy będącej powikłaniem cukrzycy. We wstępie zaznaczone są również istotne dla pracy zagadnienia biochemii i fizjologii oka z uwzględnieniem charakterystycznych procesów związanych z metabolizmem węglowodanów, procesami oksydoredukcyjnymi oraz rolą glutationu w naturalnej ochronie oka przed skutkami stresu oksydacyjnego. Autorka odnotowuje również, że w warunkach insulinooporności, w oku następują zmiany prowadzące do zaburzeń potencjału oksydoredukcyjnego, czego wynikiem mogą być zwyrodnienia charakterystyczne dla zaćmy cukrzycowej. Powyższe informacje są szczególnie cenne dla stawianej hipotezy i uzasadnienia celu pracy. Bardzo istotny pod tym względem jest również rozdział dotyczący N-acetylocysteiny i jej udziału w syntezie glutationu, a co z tym związane, utrzymywania odpowiedniego potencjału oksydoredukcyjnego komórek, jak też wybrane treści dotyczące glikokoniugatów i enzymów związanych z ich metabolizmem. Biorąc pod uwagę cel pracy można by usunąć niektóre treści ze wstępu (będącego zdecydowanie najdłuższą częścią pracy) koncentrując się na zagadnieniach związanych z równowagą oksydoredukcyjną oka, roli egzoglikozydaz lizosomalnych w stresie oksydacyjnym i etiologii zaćmy cukrzycowej, co w oczywisty sposób ugruntowuje cel badań i wskazuje ich niebagatelną wagę w obliczu

częstości występowania powikłań cukrzycowych związanych z narządem wzroku. Pod tym względem przeprowadzone badania są uzasadnione i wartościowe. Podobną uwagę natury edytorskiej mam do rozdziału „Założenia i cel pracy", który można by skrócić do jednej strony.

Eksperyment stanowiący podstawę rozprawy przeprowadzono na modelu zwierzęcym, który stanowiły samce szczurów rasy Wistar podzielone na 4 grupy (grupę kontrolną, grupę poddaną działaniu N-acetylocysteiny, grupę z wyindukowaną insulinoopornościa i grupę szczurów insulinoopornych, którym podawano N-acetylocysteinę). Po ośmiu tygodniach eksperymentu szczury uśmiercano i pobierano od nich soczewki oczu będące bezpośrednim materiałem do dalszych analiz. Na przeprowadzenie eksperymentu Autorka uzyskała zgodę Lokalnej Komisji Etycznej w Olsztynie. Wybór obiektu badań i schemat przeprowadzonego eksperymentu jest zasadny biorąc pod uwagę postawioną hipotezę i cele badań. Opis eksperymentu jest klarowny i daje możliwość jego odtworzenia. Z punktu widzenia późniejszej interpretacji wyników, zastanawia jednak fakt nierównej liczby osobników w poszczególnych grupach. Metoda zastosowana do potwierdzenia osiągniętego efektu insulinooporności nie budzi żadnych zastrzeżeń. Analizy biochemiczne polegające na uzyskaniu materiału i oznaczeniu aktywności pięciu egzoglikozydaz lizosomalnych w soczewkach oka szczurów wykonano prawidłowo z niewątpliwą znajomością procedur enzymologii. Opis metodyczny w tym zakresie można by znacząco uprościć podając stężenia stosowanych substratów i buforów, zamiast szczegółowych procedur ich przygotowania. Ogólnie, zastosowane metody eksperymentalne i analityczne pozwalają na uzyskanie wyników dających możliwość falsyfikacji stawianej hipotezy. Po lekturze tego rozdziału nasuwa mi się pewna uwaga natury terminologicznej. Uważam, że w polskich tekstach lepiej używać terminu „aktywność właściwa" i wyrażać ją w jednostkach U/mg białka niż w Katalach. Analiza statystyczna prezentowanych wyników jest odpowiednia. Dobór metod nieparametrycznych w celu stwierdzania różnic w obrębie porównywanych danych wynika z braku rozkładu normalnego danych, co było również powodem porównywania median zamiast wartości średnich. Dobór odpowiednich metod statystycznych jest kluczowy dla prawidłowej analizy wyników, a w przypadku ocenianej pracy nie budzi zastrzeżeń.

Syntetycznie opisane wyniki Autorka logicznie podzieliła na podrozdziały opisujące aktywność poszczególnych egzoglikozydaz w różnych wariantach eksperymentalnych, zestawiając uzyskane wyniki w tabelach i ilustrując wykresami z programu „Statistica". Rozdział „Wyniki" zamyka tabela podsumowująca uzyskane dane. Autorka skupiła się na

analizie statystycznej i porównaniu median w grupie kontrolnej względem grupy z wyindukowaną insulinoopornością i grupy z wyindukowaną insulinoopornością traktowanej N-acetylocysteiną względem grupy z wyindukowaną insulinoopornością. Opisane powyżej podejście uważam za uzasadnione, gdyż zmiany notowane pomiędzy powyżej opisanymi grupami są najistotniejsze z punktu widzenia falsyfikacji postawionej hipotezy. Spośród pięciu przebadanych egzoglikozydaz Autorka odnotowała wzrost (około 30%) aktywności N-acetylo-β-D-heksozoaminidazy w grupie insulinoopornej w stosunku do grupy kontrolnej. W przypadku innych enzymów nie odnotowano istotnych statystycznie różnic pomiędzy poszczególnymi grupami eksperymentalnymi. Uważam, że wartością dodaną ocenianej pracy, w obliczu braku takich danych w literaturze, jest porównanie aktywności poszczególnych egzoglikozydaz w warunkach kontrolnych, gdzie Autorka stwierdza, że zdecydowanie najaktywniejszym z badanych enzymów jest właśnie N-acetylo-β-D-heksozoaminidaza (aktywność przynajmniej 10-krotnie wyższa w porównaniu z aktywnością pozostałych egzoglikozydaz). Szkoda, że Autorka posiadając odpowiednie wyniki nie przedstawiła i nie porównała danych dotyczących zawartości białka w soczewkach oczu szczurów (np. zawartość białka w odniesieniu do świeżej masy soczewki). Uważam, że porównanie takie stanowiłoby cenny wynik i mogłoby wskazać na zmiany tempa biosyntezy białka w poszczególnych wariantach eksperymentu. Podsumowując, uważam, że opis uzyskanych wyników pozwala na znalezienie odpowiedzi na pytania stawiane w rozdziale „Założenia i cel pracy", a co za tym idzie, na weryfikację postawionej hipotezy.

Rozdział „Dyskusja" zawiera interpretację uzyskanych wyników w odniesieniu do danych z literatury w szerokim kontekście. Autorka wskazuje, że uzyskane w pracy dane mają znamiona nowości naukowej, gdyż w literaturze przedmiotu Autorka nie znalazła danych dotyczących aktywności egzoglikozydaz w soczewce oka zwierząt doświadczalnych z indukowaną insulinoopornością, jak również informacji o oddziaływaniu N-acetylocysteiny jako potencjalnego cytoprotektanta na aktywność badanych enzymów w warunkach insulinooporności. Autorka nie stwierdziła ograniczenia aktywności badanych enzymów u insulinoopornych szczurów traktowanych N-acetylocysteiną w porównaniu z grupą insulinooporną. Dlatego uważam, że w świetle uzyskanych wyników postawioną hipotezę należy odrzucić. Tym niemniej praca przyniosła cenne i oryginalne wyniki. Potwierdzenie występowania w soczewce oka 5 badanych egzoglikozydaz należy uznać za wartość poznawczą, szczególnie w świetle porównania ich aktywności i stwierdzenia, że najaktywniejszy z tych enzymów jest modulowany stanem insulinooporności. Może to mieć

wartość praktyczną jako potencjalny marker insulinooporności, a gdyby okazało się, że odnotowana zmiana koreluje ze stanem soczewki oka, może to być potencjalny marker wczesnych stanów zaćmy cukrzycowej. Oczywiście tak daleko idące alternatywne hipotezy wymagają dalszych badań i szczegółowych weryfikacji. Zastanawiam się, co Autorka sądzi o znaczeniu sposobu podania N-acetylocysteiny zwierzętom eksperymentalnym? Czy aplikacja w formie kropli do oczu o odpowiedniej formulacji nie zmieniłaby radykalnie uzyskanych wyników? Czy w świetle uzyskanych wyników i właściwości N-acetylocysteiny nie należałoby, obok pomiarów aktywności badanych w pracy enzymów, sprawdzić również poziom glutationu we krwi, a może nawet w płynie wypełniającym komory gałki ocznej, jak również aktywność enzymów szlaku pentozofosforanowego generujących NADPH niezbędnego do redukcji utlenionego glutationu?

Praca jest opatrzona wnioskami jak też streszczeniem w języku polskim i angielskim. Uważam, że dwa ostatnie wnioski są zbyt daleko idące, gdyż wsparte jedynie tendencjami zmian aktywności badanych enzymów, a nie potwierdzonymi statystycznie różnicami. W ich miejsce osobiście umieściłbym wniosek o potencjalnych właściwościach diagnostycznych pomiarów aktywności N-acetylo-β-D-heksozoaminidazy jako wczesnego markera insulinooporności, jeżeli podobne wyniki uzyskano by na przykład w krwi obwodowej, co oczywiście wymaga dodatkowych badań.

Spis piśmiennictwa zawiera przeszło 300 pozycji, z których około 30 pochodzi z ostatnich 3 lat. Autorka cytuje również klasyczne pozycje literatury z lat siedemdziesiątych ubiegłego wieku, a nawet wcześniejsze dotyczące cukrzycy. W literaturze przeważają pozycje z anglojęzycznej prasy fachowej, zdarzają się podręczniki akademickie, strony internetowe organizacji takich jak Narodowy Fundusz Zdrowia, World Health Organization czy International Diabetes Federation i charakterystyki wybranych produktów leczniczych. Autorka odwołuje się również do dostępnych sobie prac doktorskich i habilitacyjnych. Ogólnie dobór źródeł należy ocenić pozytywnie i stwierdzić, że świadczy on o bardzo szerokiej znajomości zagadnień poruszanych w pracy zarówno pod względem medycznym jak i biochemicznym.

Kończąc ocenę pracy wskazuję poniżej kilka uwag do dyskusji.

1. Autorka na str. 18 swojej dysertacji stwierdza, że „....w glikolizie tlenowej z jednej cząsteczki glukozy powstaje aż 36 cząsteczek ATP.....". Czy Autorka mogłaby wyjaśnić, skąd taki bilans glikolizy tlenowej?

2. Uważam, że na rycinie 7 należałoby inaczej rozwiązać oznaczenie procesu glikolizy. W obecnym stanie można dojść do błędnego wniosku, że Autorka nie zalicza przemian generujących ATP do procesu glikolizy. Na tym schemacie należałoby zaznaczyć reakcję dehydrogenazy 6-fosfoglukonianowej, która również generuje NADPH w szlaku pentozofosforanowym. Reakcje te są bardzo istotne w utrzymaniu odpowiedniego potencjału oksydoredukcyjnego komórek, szczególnie jeśli chodzi o redukcję utlenionego glutationu, co jak nadmienia Autorka, ma ogromne znaczenie w procesie rozwoju zaćmy cukrzycowej. Jakie inne reakcje mogą być źródłem NADPH w specyficznych warunkach soczewki oka? Czy ma tu istotne znaczenie reakcja katalizowana przez dekarboksylującą dehydrogenazę jabłczanową (tzw. enzym jabłczanowy)?

3. Rycina 10 sugeruje, że substratem dla reduktazy aldozowej jest „hiperglikemia". Należałoby zaznaczyć to w inny sposób. Biorąc pod uwagę, że zasilanie układu w NADPH jest kluczowe dla utrzymania odpowiedniego poziomu zredukowanego glutationu, a co z tym związane, ograniczenia stresu oksydacyjnego i poprawy stanu soczewki oka. Czy Autorka mogłaby rozwinąć zagadnienie konkurencji o substrat (NADPH) pomiędzy reduktazą aldozową i reduktazą glutationową? Czy ograniczenie ilości zredukowanego glutationu w warunkach hiperglikemii wynika z różnic w powinowactwie tych enzymów do NADPH, czy ze zmian poziomu ekspresji kodujących je genów, czy zależy może jedynie od dostępności substratów?

4. Jak Autorka odnosi się do mojej sugestii zmiany sposobu aplikacji N-acetylocysteiny? Czy podawanie tego związku bezpośrednio do oka (w kroplach o odpowiedniej formulacji) mogłoby zasadniczo wpłynąć na uzyskane wyniki? Czy jednoczesna suplementacja selenocysteiną niezbędną do aktywności peroksydazy glutationowej nie wspomogłaby oczekiwanego efektu cytoprotekcyjnego?

5. Czy z punktu widzenia poszerzenia możliwości interpretacji wyników w przyszłych badaniach nie należałoby, w pozyskanym materiale, oznaczać poziomu glutationu i enzymów związanych z generowaniem NADPH?

Podsumowując ocenę rozprawy doktorskiej lek. med. Pauliny Sienickiej stwierdzam, że praca kwalifikuje się do dziedziny nauk medycznych i nauk o zdrowiu i dyscypliny nauki medyczne. Zawarte w recenzji uwagi mają na celu sprowokowanie dyskusji i wskazanie możliwości wzbogacenia zakresu badań przed publikacją. Uzyskane wyniki mają niewątpliwy wkład w rozszerzenie wiedzy na temat potencjalnego zakresu sposobów zachowawczego

leczenia zaćmy cukrzycowej, a może też wczesnej diagnostyki tej choroby, co nadaje niebagatelnej wartości ocenianej rozprawie zarówno pod względem naukowym jak i utylitarnym. W związku z powyższym stwierdzam, że praca doktorska lek. med. Pauliny Sienickiej pt.: „Wpływ N-acetylocysteiny na aktywność egzoglikozydaz lizosomalnych w soczewkach szczurów z insulinoopornością indukowaną dietą bogatotłuszczową" zakresem stosowanych metod i otrzymanych wyników, a także sposobem ich dokumentacji i prezentacji odpowiada wymaganiom stawianym pracom doktorskim i spełnia warunki określone w art.13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 z późn. zm.) oraz art.179 ust.1 ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U z 2018 r.poz.1669 z późn.zm.), dlatego wnoszę do Senatu Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku o dopuszczenie lek. med. Pauliny Sienickiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Adam Tykich