

Lublin, dnia 29. 07. 2020 r.

OCENA

Rozprawy doktorskiej Pani mgr Pauliny Nowińskiej wykonanej w Zakładzie Histologii i Cytofizjologii, Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku

Tytuł pracy „Immunoreaktywność receptorów kannabinoidowych CB1 i CB2, białka S100A6, insuliny i glukagonu w komórkach wysp trzustkowych u szczurów mocznicowych”

Promotor: *Pani prof. dr hab. Irena Kasacka.*

Podstawa formalna

Zgodnie z Uchwałą Senatu Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku z dnia 26 czerwca 2020 r. zostałam powołana na recenzenta w/w rozprawy doktorskiej. Przewód prowadzony jest w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu, dyscyplina nauki medyczne.

Rozprawa została wykonana w Zakładzie Histologii i Cytofizjologii, Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej, Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku, wiodącym ośrodkiem naukowym, specjalizującym się w badaniach komórek neuroendokrynowych, w analizach immunohistochemicznych hormonów i biologicznie czynnych białek w narządach szczurów mocznicowych i szczurów z nadciśnieniem samoistnym i naczyniowo-nerkowym.

Trzustka jest jednym z najważniejszych narządów organizmu ludzi i zwierząt. Komórki endokrynowe wysp trzustkowych wydzielają insulinę i glukagon, które kontrolują odpowiednie stężenie glukozy we krwi, a tym samym gospodarkę węglowodanową organizmu. Na funkcje komórek wysp trzustkowych wpływają m.in. nieprawidłowości wydalania glukozy i hormonów regulujących jej stężenie przez nerki. Zmiany w komórkach części endokrynowej trzustki obserwuje się podczas mocznicy schyłkowego stadium przewlekłej niewydolności nerek. W wyspach trzustkowych lokalną homeostazę wydzielania insuliny i glukagonu reguluje autonomiczny układ endokannabinoidowy poprzez receptory CB1 i CB2 wpływające na utrzymanie odpowiedniego poziomu glukozy we krwi. Oba rodzaje receptorów oddziałują na wiele komórkowych szlaków sygnałowych związanych z sekrecją i przeżywaniem komórek wysp trzustkowych. Aktywacja receptorów CB1

poprzez kannabioidy wytwarzane w komórkach α wysp trzustkowych może prowadzić do wzrostu wydzielania insuliny przez komórki β . W pewnych okolicznościach receptory CB1 mogą zwiększać dokomórkowy napływ jonów wapnia, a sensorem tych jonów jest białko S100A6. Ponadto wykazuje ono zdolność wiązania innych ligandów, stąd bierze udział w regulacji wielu procesów komórkowych. Jednakże dokładne mechanizmy działania tego białka nie są w pełni poznane. Wiadomo, że stymuluje ono sekrecję insuliny przez komórki β wysp w warunkach zwiększonego stężenia wewnątrzkomórkowego wapnia w wyniku aktywacji błonowych kanałów wapniowych. Ekspresja białka S100A6 może ulegać zmianom w warunkach patologicznych. Badania ostatnich lat wskazują, że mocznik może bezpośrednio oddziaływać na dysfunkcje komórek wysp trzustkowych. Mechanizmy upośledzonego wydzielania insuliny pozostają jednak niejasne. Stąd Doktorantka bardzo trafnie podjęła się nowatorskich badań oceny immunoreaktywności receptorów kannabinoidowych CB1 i CB2, białka S100A6, insuliny i glukagonu w komórkach wysp trzustkowych u szczurów z eksperymentalnie wywołaną mocznicą.

Ocena struktury pracy

Rozprawa doktorska Pani mgr Pauliny Nowińskiej liczy 83 strony przejrzystego wydruku komputerowego ze 111 pozycjami piśmiennictwa. Zawiera tekst i dokumentację zaprezentowaną na wysokiej jakości 14 mikrofotografiach, 2 barwnych rycinach i w 7 tabelach. Układ pracy jest typowy dla rozpraw doktorskich.

Pracę obejmuje: *Spis treści, Wykaz skrótów, Wstęp, Założenia i cel pracy, Materiał i metody, Wyniki badań, Dyskusję, Wnioski, Streszczenia w język polskim i angielskim, Piśmiennictwo, Spis tabel i rycin.*

Ocena merytoryczna

We *Wstępie* Doktorantka w bardzo przemyślany i merytoryczny sposób wprowadza czytelnika w te tematy, które istotne są dla zrozumienia prezentowanych wyników badań i ich interpretacji, co wskazuje na wnikliwe potraktowanie tematu badań. Podane treści dotyczą przebiegu przewlekłej choroby nerek, zaburzeń gospodarki węglowodanowej i wapniowo-fosforanowej oraz leczenia przewlekłej choroby nerek. W przystępny sposób przedstawiono budowę i funkcje trzustki. Ponadto Doktorantka podsumowała dotychczasową wiedzę o układzie endokannabinoidowym ze szczególnym uwzględnieniem receptorów CB1 i CB2 w części endokrynowej trzustki. Przedstawiła główne szlaki sygnałowe aktywowane przez te receptory związane z sekrecją oraz przeżywaniem komórek wysp trzustkowych. Opisała białko S100A6, kanały jonowe ze szczególnym uwzględnieniem kanałów wapniowych oraz ich udział w wydzielaniu insuliny.

Cele badań zostały poprawnie sformułowane. Doktorantka podjęła się oceny morfologii wysp trzustkowych w preparatach barwionych metodą H+E, mikroskopowej oceny zmian immunoreaktywności receptorów kannabinoidowych CB1 i CB2, białka S100A6, kanałów wapniowych, insuliny i glukagonu u szczurów z indukowaną chirurgicznie mocznicą i u zwierząt z prawidłową czynnością nerek.

Kolejnym celem pracy były wykonanie pomiarów morfometrycznych parametrów wysp trzustkowych oraz intensywności reakcji immunohistochemicznych u szczurów mocznicowych i kontrolnych.

Materiał archiwalny pochodził od 18 szczurów Wistar podzielonych na trzy grupy. Dwie grupy były kontrolne. W pierwszej grupie zwierzęta nie były poddawane żadnym zabiegom, a w drugiej szczury poddano pozornemu zabiegowi chirurgicznemu. Trzeciej grupie zwierząt wywołano doświadczalną mocznicę. Po 28 dniach, od zabiegu chirurgicznego, pobierano krew z serca i mierzono w surowicy stężenie mocznika i kreatyniny. Po uśmierceniu zwierząt pobrano do badań ogon trzustki. Po utrwaleniu materiału w płynie Bouin'a wykonano parafinowe bloczki rutynową techniką histologiczną. Skrawki badanego narządu barwiono metodą H+E i oceniono morfologię wysp trzustkowych. Dla wykrycia antygenów w komórkach wyspach trzustkowych przeprowadzono reakcje immunohistochemiczne z użyciem 6 pierwotnych przeciwciał (skierowanych przeciwko receptorom CB1, CB2, białku S100A6, kanałom wapniowym, insulinie i glukagonowi). We właściwy sposób wykonano reakcje kontrolne negatywną i pozytywną. Wszystkie preparaty oceniano w mikroskopie świetlnym Olympus BX41 posiadającym tor wizyjny, sprzężony z komputerem PC, wyposażonym w program morfometryczny do analizy obrazu NIS-Elements Advanced Research firmy Nikon. Dokonano analizy morfometrycznej wysp trzustkowych tj. pola powierzchni, długości, szerokości oraz ich krągłości oraz określono stopień intensywności reakcji immunohistochemicznych badanych antygenów tkankowych. Analiza statystyczna w/w parametrów została wykonana przy użyciu arkusza kalkulacyjnego Microsoft Office Excel 2010 oraz pakietu statystycznego Statistica version 12.5 PL. Wybór metod i technik badawczych, jak i sposób ich przeprowadzenia jest odpowiedni dla tego rodzaju badań i uzyskania wiarygodnych wyników.

W rozdziale *Wyniki* Pani mgr Paulina Nowińska przedstawiła w sposób wyczerpujący uzyskane rezultaty w postaci dobrej jakości barwnych mikrofotografii oraz przejrzystych tabel. Trzustka obu grup kontrolnych zwierząt miała podobną morfologię, dlatego wykorzystano wyniki badań od szczurów pozornie operowanych. U zwierząt mocznicowych, na poziomie mikroskopu świetlnego, Autorka stwierdziła zmiany histopatologiczne manifestujące się większą powierzchnią i nieregularnym kształtem wysp trzustkowych w porównaniu z ich prawidłową morfologią u zwierząt kontrolnych. Badania morfometryczne wykazały większe pole powierzchni i większą długość oraz mniejszą krągłość wysp trzustkowych. W wyspach pochodzących od szczurów z chirurgicznie wywołaną mocznicą wystąpił wzrost stopnia intensywności immunozabarwienia receptorów CB2, kanałów wapniowych oraz glukagonu w porównaniu do zwierząt kontrolnych. Przeciwnie u tych zwierząt nastąpił spadek immunozabarwienia receptorów CB1, białka S100A6 i insuliny. Analiza densytometryczna potwierdziła w/w obserwacje w mikroskopie świetlnym dotyczące różnicy stopnia intensywności reakcji immunohistochemicznych. Dodatkowo wykazała największą różnicę gęstości optycznej receptorów CB2 i białka S100A6.

W rozdziale *Dyskusja* Doktorantka analizuje otrzymane wyniki na tle piśmiennictwa polskiego i światowego, wykazując się dużą wiedzą i umiejętnością przedstawienia zależności niezbędnych do interpretacji wyników badań własnych. Pani mgr Paulina Nowińska w sposób wystarczający podejmuje próbę wyjaśnienia

mechanizmów zachodzących w komórkach endokrynowych wysp trzustkowych w powiązaniu z doświadczalnie wywołaną mocnicą u szczurów.

Wyniki uzyskane przez Doktorantkę wykazały, że podczas przewlekłej niewydolności nerek dochodzi do zaburzeń morfologii i funkcji komórek wysp trzustkowych. Zmiany te mogą być następstwem rozregulowanych mechanizmów włączonych w utrzymanie homeostazy organizmu, co może stanowić proces adaptacyjny, aby ograniczyć zaburzenia gospodarki wapniowej podczas mocnicy.

Na podstawie uzyskanych wyników Autorka opracowała 4 poprawne wnioski. Rozprawa doktorska ma charakter nowatorski i poznawczy, a uzyskane wyniki w przyszłości mogą mieć znaczenie praktyczne w celu opracowania odpowiednich metod terapii.

Ze względu na obowiązek recenzenta poniżej zamieszczam uwagi, które nie zmniejszają wartości merytorycznej przedstawionej do oceny pracy doktorskiej, a jedynie mogą być pomocne w przygotowaniu manuskryptu do druku:

- brakuje gatunku zwierzęcia na którym wyprodukowane zostało poliklonalne przeciwciało skierowane przeciwko ludzkiej insulinie na str. 30,
- w rozdziale „Materiał i metody” str. 28/29 zdanie jest niedokończone „Aby zapobiec wychłodzeniu ciała ...”,
- w tabeli 4 zakradł się błąd, gdyż po angielsku widnieje wartość p-value,
- brak w piśmiennictwie pracy *Okazaki i wsp.* 1994 cytowanej na str. 59,
- nie dostrzegłam cytowania dwóch pozycji piśmiennictwa 10 oraz 89.

Podsumowanie i wniosek końcowy

Przedłożoną do oceny rozprawę doktorską Pani mgr Pauliny Nowińskiej oceniam wysoce pozytywnie. W pełni spełnia wszystkie wymogi ustawowe stawiane rozprawom doktorskim w świetle art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2014 r., poz. 1852 ze zm. w Dz. U z 2015 r. poz. 249). i wnioskuję o dopuszczenie Doktorantki do dalszych czynności przewodu doktorskiego.

Równocześnie wnoszę o wyróżnienie rozprawy doktorskiej stosowną nagrodą ze względu na aktualną tematykę, stanowiącą ważną część światowych badań i wysoką wartość naukową i poznawczą.

**KIEROWNIK ZAKŁADU
Histologii i Embriologii**

Jadwiga Jaworska-Adamu
Prof. dr hab. Jadwiga Jaworska-Adamu