



Kraków, 05.03.2019

Ocena rozprawy doktorskiej

mgr Anny Gajos-Draus

pt. „Naczyniowy stres oksydacyjny i jego zapobieganie przy pomocy treningu fizycznego i azotynów w modelu cukrzycy typu I u szczura. Nowa koncepcja stresu oksydacyjnego”

Dysfunkcja komórek śródbłonna naczyniowego jako podstawowy mechanizm schorzeń sercowo-naczyniowych, stanowi bardzo istotny problem kliniczny. Leży ona u podłoża miażdżycy, nadciśnienia tętniczego oraz niewydolności serca i jest podstawowym mechanizmem zwiększonego ryzyka sercowo-naczyniowego w cukrzycy. Schorzenia te stanowią jedną z najważniejszych przyczyn zgonów w populacji polskiej jak i światowej. Dlatego badania nad mechanizmami i występowaniem dysfunkcji śródbłonkowej, są szczególnie ważne. W prezentowanej rozprawie mgr Anna Gajos-Draus podejmuje ważny i dotychczas bardzo słabo zbadany problem tak zwanej „sezonowej” dysfunkcji śródbłonna. Fakt, iż dysfunkcja śródbłonna w cukrzycy jest związana ze stresem oksydacyjnym i nadprodukcją anionorodnika ponadtlenkowego przez oksydazy NADPH jest szeroko znany od niemal 20 lat. Jednakże, jak dotąd, nie przełożyło się to na powstawanie nowych metod leczenia i prewencji. W ostatnich latach natomiast, poszerzające się zrozumienie złożonego charakteru rodziny oksydaz NADPH (poczynając od Nox1 aż po Nox5), zrodziło możliwości bardziej „celowanego hamowania” wybranych enzymów z rodziny oksydaz NADPH. Leży u jej podstaw obserwacja, iż niektóre z tych enzymów mogą mieć kluczowe funkcje fizjologiczne, a przez to ich hamowanie może być nawet szkodliwe. Pani mgr Anna Gajos-Draus podjęła właśnie ten ciekawy nurt badania, proponując oryginalną hipotezę, iż kluczowym wykładnikiem stresu oksydacyjnego może być nie tyle klasycznie pojmowana równowaga pomiędzy układami pro- i anty- oksydacyjnymi ale bardziej uszczegółowiona, dysregulacja w układach Nox2/NFkB i Nox4/NRF2. Jest to ciekawa i ważna koncepcja gdyż nie koncentruje się wyłącznie na ekspresji samych oksydaz

naczyniowych ale wiąże pojęcie stresu oksydacyjnego z układami przekaźnictwa wewnątrzkomórkowego i zmianami czynnościowymi komórek naczyniowych. Ten aspekt hipotezy i pracy jest szczególnie oryginalny i budzi moje zainteresowanie. Co więcej podjęte w ocenianej rozprawie doktorskiej badania przenoszą dotychczasowe obserwacje z czysto teoretycznego i hipotetycznego obszaru badań w hodowli komórkowej do sytuacji patofizjologicznej wybranych czynników ryzyka miażdżycy na przykład analizowanej przez doktorantkę - cukrzycy. W szczególności, na uznanie zasługuje wielostronne podejście do trudnego tematu, wymagające ekspertyzy i umiejętności nie tylko w zakresie nie tylko badań śródbłonna naczyniowego, lecz także zagłębienia się w mechanizmy opisywanych zjawisk, w tym w mechanizmy molekularne.

Licząca 100 stron praca ma klasyczną budowę. składa się z wykazu skrótów, wstępu (określonego nietypowo – „kontekstem literaturowym”), celów i założeń pracy, materiału i metodyki, wyników, dyskusji, streszczenia oraz 208 pozycji aktualnego piśmiennictwa oraz listy badań klinicznych o których autorka dyskutowała ze strony ClinicalTrials.gov. Autorka załączyła też 3 suplementy – 1 zawierający dodatkowe wyniki, a 2 opublikowane prace częściowo związane z tematyką doktoratu. Praca jest wzbogacona osiemnastoma starannie przygotowanymi, czasem wielopanelowymi rycinami oraz czterema zamieszczonymi we wstępie oraz wynikach 5 Tabelami. Sposób przedstawienia pracy jest czytelny i nie budzi zastrzeżeń. Pracę czyta się z przyjemnością. Na uwagę zasługuje bardzo sprawne posługiwanie się autorki terminologią specjalistyczną.

We wstępie Doktorantka szczegółowo opisuje najpierw zagadnienia podstawowej biologii redox i jej rolę w patogenezie schorzeń układu sercowo-naczyniowego odnosząc się do biochemii komórek śródbłonna, a także omawia podstawowe aspekty biologii i biochemii oksydaz NADPH, rodziny enzymów odgrywających kluczową rolę w patogenezie stresu oksydacyjnego których dotyczy praca. W dalszej części wstępu mgr Gajos-Draus omówiła wybrane mechanizmy dysfunkcji śródbłonkowej i jej znaczenie w schorzeniach układu sercowo-naczyniowego. Podczas gdy wstęp jest napisany jasno i dobrze uzasadnia wybór tematu i postawione hipotezy, szereg istotnych aspektów zwróciło moją uwagę. Omawiając literaturę autorka pominęła kilka kluczowych prac opisujących rolę oksydaz NADPH w cukrzycy a także ich identyfikację w naczyniach krwionośnych człowieka. To prawda, że są to publikacje sprzed wielu lat, ale zawsze wskazane jest cytowanie oryginalnych publikacji a nie artykułów poglądowych dla uzasadnienia podstawowych tez dla hipotezy badawczej. Co dziwne, pominięto kluczową dla tej rozprawy pracę pokazującą wpływ Nox4 na dysfunkcję śródbłonna naczyniowego, opublikowane przez zespół Prof. Morawietza w 2016 roku (Langbein H et al., Eur Heart J, 2016). Podobnie nie omówiono kluczowej publikacji Alp et al. (J Clin Invest, 2003)

która dotyczyła właśnie mechanizmów interakcji stresu oksydacyjnego z układem eNOS/NO w cukrzycy indukowanej STZ, którą autorka się zajmowała!

Szereg pojęć jest w moim odczuciu nie do końca precyzyjnych. Na przykład - pojęcie „cukrzycowy stres oksydacyjny” stanowi dość nietypowe pojęcie, gdyż sugeruje różnicę w definicji w stosunku do „niecukrzycowego stresu oksydacyjnego”. Tego aspekty, jednak, autorka nie tłumaczy. Innym przykładem może być tytuł: „Śródbłonkowy NO jako element promiażdżycowej sieci regulacyjnej” Takie ujęcie może sugerować iż śródbłonkowy NO jest promiażdżycowy a wtrącenie „a właściwie jego niedobór,” wydaje się nie oddawać w pełni istoty problemu.

Omawiając naczyniowe efekty Nox1/2/4/5 (a szczególnie Nox 4), autorka skoncentrowała się na pracach które popierają jej hipotezy, w nieco niewystarczający sposób omawiając kontrowersje dotyczące tej interesującej cząsteczki, pokazujące ochronne działania blokady Nox4/Nox1 i potencjalne szkodliwe działanie Nox4 w wybranych sytuacjach patofizjologicznych.

Moją uwagę, wreszcie zwróciła Rycina 3, i przedstawienie przez autorkę przestrzennej orientacja produkcji anionorodnika ponadtlennego. Wymaga ona dodatkowego komentarza jako iż podczas gdy klasycznie oksydazy NADPH produkują anionorodnik ponadtlenny do przestrzeni zewnątrzkomórkowej, w naczyniowych oksydazach sytuacja ta nie jest aż tak jednoznaczna. Ponadto nie jest jasne czy w przypadku Nox4 najpierw powstaje O₂⁻. a dopiero w drugim etapie H₂O₂. W pracy poświęconej Nox4 warto byłoby nad takimi kontrowersjami dotyczącymi Nox4 podyskutować.

Uwagi te, jednak, nie pomniejszają mojej wysokiej oceny Wstępu, a raczej „kontekstu literaturowego”. Wprowadzone zostały wszystkie konieczne dla dalszego zrozumienia pracy terminy i omówiony, w podstawowym zakresie, aktualny stan wiedzy.

Podsumowując ocenę tej części rozprawy, we wstępie mgr Gajos-Draus jasno przedstawiła potrzebę określenia mechanizmów zależnych od nierównowagi Nox2/NFκB a Nox4/NRF2 w dysfunkcji śródbłonka w modelu zwierzęcym cukrzycy. Przejrzyste ujęcie tematu we wstępie wskazuje, że Doktorantka bardzo dobrze zapoznała się z omawianymi zagadnieniami i potrafi wiedzę syntetyzować i jasno przekazać.

Celem pracy mgr Anny Gajos-Draus było zbadanie mechanizmu naczyniowego stresu oksydacyjnego, a w szczególności weryfikacja hipotezy, że na poziomie naczyniowym, śródbłonkowy NO jest niezbędny dla utrzymania równowagi między aktywnością prozapalnego i naczynio-uszkodzającego systemu Nox2/NF-κB i antyoksydacyjnego, przeciwzapalnego i w konsekwencji naczynio-ochronnego systemu Nox4/Nrf2. Cele szczegółowe obejmowały (1)

analizę zmian w czasie ekspresji (i wybranych aspektów aktywności) systemów Nox2/NF- κ B, Nox4/Nrf2 i NO/eNOS w sercu i nerkach szczurów z cukrzycą; (2) określenie czy interwencje, o których wiadomo, że zwiększają biodostępność śródbłonkowego NO (trening fizyczny i pokarmowa suplementacja azotynów), zapobiegają nierównowadze systemów Nox2/NF- κ B i Nox4/Nrf2 w cukrzycy; (3) zbadanie czy przewlekłe zahamowanie eNOS (za pomocą inhibitora L-NAME) skutkuje zmianami w systemach Nox2/NF- κ B, Nox4/Nrf2 i NO/eNOS analogicznymi do towarzyszących przewlekłej cukrzycy, oraz czy pokarmowa suplementacja azotynów przeciwdziała zmianom wywołanym przez inhibitor eNOS.

Cele te zostały jasno sformułowane i zostały zrealizowane w toku badań w ramach prezentowanej rozprawy doktorskiej.

Opis metodyki badań jest rzetelny i dokładny. Wskazuje na samodzielność wykonanej pracy, a także na świadomy wybór wiarygodnych i dostępnych technik badawczych. Na uwagę zasługuje bardzo dokładny opis poszczególnych technik i ich walidacji, świadczący, iż autorka zdaje sobie sprawę ze znaczenia potencjalnych problemów jakie stwarza wiarygodna ocena produkcji wolnych rodników tlenowych w tkankach i komórkach. Cenne mogłoby być zilustrowanie przynajmniej części stosowanych technik zapisami danych z aparatury (tzw. ang. „raw data”), tak jak elegancko autorka pokazała takie dane w odniesieniu do Western Blottingu.

Na uwagę zasługuje bardzo sprawne stosowanie i dokładny opis przez autorkę modelu zwierzęcego z jego bardzo dobrą charakteryzacją. Jednocześnie, autorka wykazuje również zaawansowane podejście w badaniu molekularnych mechanizmów stresu oksydacyjnego i dysfunkcji śródbłonka, przedstawiając bardzo elegancko wykonane badania Western blotting i immunohistochemiczne. Zwraca uwagę zastosowanie dużej ilości technik badawczych i bardzo wnikliwy opis wykonanych badań.

Podczas gdy ogólnie, wybrane przez Doktorantkę techniki pomiaru sercowej produkcji anionorodnika ponadtlenkowego i NO należą do szeroko stosowanych i wiarygodnych, warto zauważyć, iż ostatnio ukazujące się zalecenia metodologiczne pomiarów wolnych rodników tlenowych wskazują na celowość zastosowania co najmniej dwóch, jeśli nie trzech niezależnych metod pomiaru produkcji tych wyjątkowo niestabilnych w materiałach biologicznych cząsteczek. Poza pomniejszych pytaniami jakie się zrodziły podczas lektury, większość metod opisanych w rozdziale nie budzi wątpliwości. Podsumowując, szczegółowy opis metodyczny stosowanych technik badawczych wskazuje, iż badania zarówno molekularne jak i czynnościowe były przeprowadzone przez doktorantkę dokładnie, ze szczególnym zrozumieniem poszczególnych technik.

Wyniki badań obejmują 14 wielopanelowych, dobrze i bardzo profesjonalnie przygotowanych i wyraźnie opisanych Rycin oraz 2 Tabele. W pierwszej

części „Wyników” mgr Anna Gajos-Draus pokazała i scharakteryzowała zmiany wybranych aspektów układów pro- i anty-oksydacyjnych w badanym modelu cukrzycy. Początkowo przedstawiono charakterystykę zwierząt doświadczalnych, aby następnie omówić chronologię zmian cukrzycowych w zakresie ekspresji homologów oksydaz NADPH i śródbłonkowego NO oraz w ich komórkowych efektorach, jakimi prawdopodobnie są systemy Nrf2 i NFκB. Kolejną, szczególnie cenną część pracy stanowi analiza efektów interwencji za pomocą treningu fizycznego i azotynów w diecie które zapobiegają zmianom wywoływanym w badanych układach przez cukrzycę. W ostatniej części Wyników doktorantka pokazała, iż efekty blokady NOS za pomocą L-NAME naśladują zmiany cukrzycowe, ale nie zapobiegają im azotyny, co jest dość ciekawe, jako że azotyny teoretycznie powinny działać z pominięciem eNOS.

Podczas gdy większość wyników jest opisana jasno, kilka aspektów wzbudziło moje dodatkowe zainteresowanie oraz szereg pytań.

Autorka skoncentrowała się na pomiarach O₂-. Tymczasem pomiary H₂O₂ byłyby równie istotne, szczególnie w kontekście aktywności Nox4. Ponadto w kontekście równowagi Nox2/Nox4 rodzi się pytanie, dlaczego NOX2 nie przyczynia się do aktywacji NRF2 skoro O₂-. Może być efektywnie dysmutowany przez badane przez autorkę 3 lizoformy SOD. Obserwowane przez doktorantkę obniżenie ich ekspresji może to zjawisko tłumaczyć i jest w mojej ocenie niezwykle ważnym potencjalnie wynikiem przedstawianej pracy. Poznanie aktywności tych enzymów a nie tylko ich ekspresji pozwoliłoby na zgłębienie tego procesu choć wyniki ekspresji uważam na tym etapie za wystarczająco przekonujące. W tym kontekście ciekawe byłoby określenie efektu katalazy na dysfunkcję śródbłonka, w różnych badanych warunkach po interwencjach, mogłoby dostarczyć bardzo istotnych danych dotyczących roli H₂O₂ i Nox4.

Bardzo ciekawe byłoby poznanie w jaki sposób zachowuje się funkcja śródbłonka której pomiary są proste a jako że problem ten stanowi kluczowy element hipotezy badawczej, brak bezpośredniego pomiaru funkcji śródbłonka naczyniowego, budzi zastanowienie.

Zastanawiam się też, dlaczego autorka, stawiając hipotezę o roli eNOS i NO w regulacji równowagi Nox2/Nox4. nie zdecydowała się zbadać myszy z usuniętym genem eNOS. Niewątpliwie dałoby to znacznie bardziej jednoznaczna informację o związku przyczynowo skutkowym.

Jak wspominałem w omówieniu metodyki, cenne byłoby zastosowanie więcej niż 1 metody pomiaru anionorodnika ponadtlenkowego, zgodnie z publikowanymi obecnie wytycznymi analizy wolnych rodników tlenowych.

Sugerowałbym autorce, w przyszłości, bardzo dokładne określanie parametrów mierzonych unikając aby unikać niedokładności jak np. użycie stwierdzeń „aktywacja NFkB” lub „aktywacja NRF2”, które w mojej opinii bezpośrednio mierzone nie były.

Zastanawia mnie wreszcie enigmatyczne stwierdzenie liczby zwierząt w części rycin i tabeli – np. autorka mówi o 8-14 eksperymentów. To jest bardzo ważny problem, gdyż nie określono co „eksperyment” oznacza. Kluczowe jest precyzyjne określanie ilości biologicznych, niezależnych powtórzeń (tj. niezależnych zwierząt, od których pobrano próbki). Co więcej bardzo ważne jest pytanie czy przeprowadzono 8 czy 14 eksperymentów, a jeśli liczby badanych zwierząt były różne w poszczególnych grupach badanych w ramach jednego doświadczenia to czym ta decyzja była podyktowana. Podczas gdy rozumiem, iż w niektórych publikacjach jest to przyjęty sposób, nie ma on na ogół uzasadnienia merytorycznego, a może budzić problemy w analizie statystycznej.

Wnioski przedstawione są zwięzłe i dokładnie. Są klarowne i odpowiadają postawionym przez Doktorantkę celom badania, w pewnych miejscach wykraczając poza postawione cele.

Wydaje się iż sugestie autorki we wnioskach, iż ochronne i przeciwmiażdżycowe działanie NO tłumaczyć należy przede wszystkim jego wpływem na równowagę Nox2/NFkB i Nox4/NRF2, stanowi w mojej opinii częściową nadinterpretację uzyskanych wyników. Jest to jedna z możliwości ale wykorzystane modele doświadczalne w mojej opinii nie pozwalają na aż tak jednoznaczne stwierdzenie dotyczące tego ważnego i obecnie szeroko roztrząsanego problemu naukowego.

Dyskusja pracy jest przeprowadzona w sposób interesujący. Omówione zostały wszystkie główne obserwacje poczynione przez Doktorantkę, w kontekście opublikowanej literatury. Warto podkreślić iż Dyskusja jasno pokazuje jak dobrze podjęte badania wpisują się w dostępną literaturę na temat roli Nox4/NRF2 w cukrzycowym uszkodzeniu narządowym. Autorka cytuje 208 prac, właściwie dobierając piśmiennictwo, obejmujące najważniejsze publikacje, w tym szereg prac najnowszych. Jak wspomniałem omawiając Wstęp kilka ważnych prac pominięto, zapewne w gąszczu wielu prac które zostały omówione. Dyskusję charakteryzuje świadoma i krytyczna analiza uzyskanych wyników oraz zasługująca na uwagę ostrożność w ich interpretacji.

Uważam, że obserwacje poczynione w obecnej pracy będą stanowić cenną podstawę do przyszłych badań, a z tych wyników może skorzystać wiele zespołów badawczych w toczącej się obecnie dyskusji nad rolą Nox2 i Nox4 w patologii naczyniowej.

Podsumowując, przedstawiona mi do oceny Rozprawa Doktorska mgr Anny Gajos-Draus wskazuje na dojrzałość naukową doktorantki, zarówno w podejmowaniu tematyki i celów badań

jak i w ich konsekwentnej realizacji przy pomocy starannie dobranej metodyki, a przedstawione uwagi są wyrazem zainteresowania tematem jakie we mnie lektura Rozprawy wzbudziła, i w żadnym stopniu nie umniejszają jej wartości. Uważam, iż praca ta stanowi cenny wkład do światowego piśmiennictwa w tym zakresie.

W związku z tym z całą pewnością stwierdzam, iż przekazana mi do oceny praca spełnia wszystkie wymogi rozprawy na stopień doktora nauk biologicznych i mam zaszczyt przedstawić Wysokiej Radzie Centrum Medycznego Kształcenia Podyplomowego w Warszawie wniosek o dopuszczenie mgr. Anny Gajos-Draus do dalszych etapów przewodu doktorskiego, a także wnioskuję o **wyróżnienie** prezentowanej rozprawy doktorskiej, gdyż stanowi ona ważny wkład w wiedzę dotyczącą badanej tematyki, a wyniki są bardzo wielostronne i bardzo starannie i elegancko zaprezentowane, wskazując na całkowicie nowe mechanizmy regulacji dysfunkcji śródbłonna naczyniowego w cukrzycy.



Prof. dr hab. med. Tomasz Guzik

Laboratorium Medycyny Translacyjnej
Katedra Chorób Wewnętrznych i Medycyny Wsi
Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie