

Bydgoszcz dn. 21.06.2019

Ocena rozprawy doktorskiej Pani mgr Agnieszki Kij

Ocenę przygotowano w związku z pismem Dziekana Wydziału Farmaceutycznego Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego.

Informacje ogólne

Podstawą ubiegania się mgr Agnieszki Kij o stopień naukowy doktora jest monografia zatytułowana „Ocena profilu eikozanoidów w zwierzęcych modelach dysfunkcji śródbłonna naczyniowego”, powstała pod kierunkiem dr hab. Maria Walczak, prof. UJ z udziałem dr Kamila Kusia jako promotora pomocniczego.

Rozprawa doktorska zawiera 157 stron i składa się z: informacji o finansowaniu projektu będącego podstawą dysertacji, streszczenia w języku polskim i angielskim, wstępu będącego wprowadzeniem do aspektu biologicznego i analitycznego tematu, celu pracy, opisu zastosowanej metodologii, wyników, ich dyskusji, wniosków, bibliografii składającej się z 161 pozycji, spisu tabel (19) i rycin (42) oraz wykazu skrótów.

Ocena rozprawy doktorskiej

Rozprawa jest skonstruowana w sposób estetyczny i przejrzysty. W pracy nie znaleziono błędów stylistycznych, interpunkcyjnych, ortograficznych lub gramatycznych. Jedynie w spisie literatury zauważono pewną niekonsekwencję w przytaczaniu nazw czasopism spowodowaną najprawdopodobniej stosowaniem jednego z programów do automatycznego wprowadzania referencji, a które niestety często wprowadzają błędy edytorskie (np. w pozycji 72 znajduje się skrót Breast Cancer Res., a zaraz za nim pełna nazwa Breast Cancer Research). Streszczenie stanowi dobrą syntezę tematu odzwierciedlającą poszczególne części rozprawy podkreślając najważniejsze informacje opisane w szczegółach w kolejnych rozdziałach rozprawy. Część teoretyczna wprowadza czytelnika w temat eikozanoidów jako związków o szerokich funkcjach biologicznych, pokazując również złożoność tej grupy związków pod kątem biosyntezy i metabolizmu. Doktorantka wspomina nawet o „eikozanomicie” czyli nowej gałęzi lipidomiki, rozwijającej się niezależnie właśnie ze względu na różnorodność biochemiczną tej grupy związków oraz wyzwania związane z ich analizą. Druga część wstępu stanowi

syntetyczny przegląd technik analitycznych stosowanych w analizie eikozanoidów, potwierdzający złożoność problemu. Bardzo dobre podsumowanie wad i zalet poszczególnych technik, tj. ELISA, GC-MS/MS i UPLC-MS/MS zostało przedstawione w Tabeli 1.4.

Kolejną częścią dysertacji jest Cel pracy, pod którym mieści się kilka założeń, z czego głównymi są opracowanie i walidacja metod analitycznych do oznaczania stężenia eikozanoidów w próbkach biologicznych oraz ich zastosowanie do oceny profilu wybranych przekazników lipidowych z różnych szlaków metabolizmu kwasu arachidonowego, w trzech zwierzęcych modelach dysfunkcji śródbłonna naczyniowego. Zaprezentowany cel pracy sygnalizuje szeroki zakres pracy włożonej w realizację tak ambitnych założeń, co zresztą znajduje potwierdzenie w dalszych częściach rozprawy, jak choćby już kolejnym rozdziale pt. Materiał i metody. Po zapoznaniu czytelnika z zastosowanym zapleczem instrumentalnym, wykorzystanymi materiałami i odczynnikami oraz metodyką Autorka opisuje modele wykorzystane do badań, warunki bytowe i przedstawia numery zgód właściwych Komisji Etycznych. Następnie przedstawione zostają materiały biologiczne użyte do badań, warunki ich poboru (próbki rzeczywiste) lub przygotowania (matryce zastępcze), przechowywania oraz opis warunków prowadzonej hodowli komórkowej linii 4T1 wykorzystanej następnie w mysim modelu przerzutującego raka sutka. W kolejnych podrozdziałach Pani mgr Agnieszka Kij precyzyjnie opisuje wszystkie kroki związane z preparatyką próbek, wykorzystane metody analityczne oraz zastosowaną walidację opracowanych metod definiując poszczególne parametry zawarte w tejże walidacji. Właśnie takie szczegółowe i krytyczne, jak następnie pokazuje dyskusja wyników walidacji, podejście do aspektu opracowania metodyki warte jest podkreślenia, gdyż pokazuje zrozumienie ważności tego etapu prac i jego wpływu na wyniki badań właściwych próbek, a tym samym interpretację biologiczną uzyskanych wyników i dowodzi wysokiej jakości przeprowadzonych badań. Kolejnym punktem tego rozdziału jest przedstawienie zastosowanych w pracy zwierzęcych modeli dysfunkcji śródbłonna naczyniowego. W poszczególnych opisach wywoływania konkretnego efektu biologicznego brak jest odniesień do literatury, co wskazywałoby że zostały one opracowane przez Doktorantkę/zespół naukowy w którego skład wchodziła Doktorantka. Jeśli metodologia doświadczenia została zapożyczona z literatury należałoby umieścić w tym miejscu odpowiednie referencje, jeśli jest to koncepcja własna sugerowałabym wprowadzenie odpowiedniego słowa komentarza. Wyjątek stanowi mysy model nadciśnienia tętniczego krwi wywołany przez angiotensynę II, którego opis jednoznacznie wskazuje na fakt opracowania tego modelu przez naukowców ośrodka z Uniwersytetu Południowej Danii, gdzie Doktorantka przebywała w ramach programu Erasmus wykonując badania do niniejszej pracy. Jedynym

mankamentem którego można się doszukać w tej części pracy jest brak podania liczby osobników w poszczególnych grupach w poszczególnych modelach doświadczalnych; informacja ta znajduje się dopiero przy opisie wyników eksperymentów. Poza tym drobnym niedociągnięciem opisy są bardzo przejrzyste, podział na grupy w odpowiednich modelach czytelny i zrozumiały. Pierwsze pytanie, które nasuwa mi się przy tej części pracy wiąże się z podażą substancji w wodzie i/lub pokarmie, mianowicie trudno jest kontrolować dawki przyjęte przez poszczególne osobniki oraz metodę normalizacji wynikających z tego różnic. W jaki sposób ten problem został zaadresowany? Kolejne pytanie dotyczy doboru szczepów w modelu niedoboru tlenu azotu wywołanym przez L-NAME (C57Bl/6) oraz modelu przerzutującego raka sutka wywołanym inokulacją komórek nowotworowych linii 4T1(Balb/c). Szczepy Balb/c i C57Bl/6 są często stosowane naprzemiennie jako jedne z najpopularniejszych w badaniach biomedycznych. Czy Doktorantka potrafi wyjaśnić czym podyktowany był wybór tych różnych szczepów w poszczególnych modelach?

W kolejnym podpunkcie rozdziału poświęconemu metodyce badań Pani mgr Kij przedstawia testy statystyczne, którymi posłużyła się w opracowaniu wyników przeprowadzonych analiz. Rozpoczęcie analiz od sprawdzenia rozkładu i jednorodności wariancji, a następnie dobranie w zależności od wyników tych testów odpowiednich metod parametrycznych lub nieparametrycznych do oceny znamienności statystycznej, pokazuje świadome podejście Autorki do analizy i interpretacji wyników. Doktorantka, zgodnie z ogólnie ustanowionymi kryteriami przyjęła wartość $p < 0.05$ za granicę znamienności statystycznej. Ostatnio pojawia się coraz więcej głosów i publikacji naukowych stwierdzających, że wartość „p” nie powinna być stosowana tak restrykcyjnie jak dotychczas i że należy starać się bardziej wykorzystywać wiedzę biologiczną a priori, co ma pomóc w uzyskiwaniu informacji istotnych, a niejednokrotnie pomijanych właśnie ze względu na wartość $p > 0.05$. Czy Doktorantka może się ustosunkować do takiego stwierdzenia?

Kolejną część pracy stanowi przedstawienie wyników z przeprowadzonych badań. Pierwsze dane dotyczą jednoczesnego oznaczania metabolitów PGI₂ oraz TXA₂ w osoczu i moczu myszy. Kolejno w treści, rycinach i tabelach znajdują się informacje dotyczące przygotowanych metod UPLC-MS/MS oraz wyniki walidacji metod. Walidację, ze względu na endogeny charakter badanych związków przeprowadzono w matrycach zastępczych (sztucznym osoczu i moczu) z wyjątkiem oceny efektu matrycy, który to parametr został oceniony także w matrycach rzeczywistych. Następnym elementem tego rozdziału jest opis wyników opracowania i walidacji metody jednoczesnego oznaczania eikozanoidów z różnych szlaków metabolizmu kwasu arachidonowego w osoczu oraz homogenatach płuc myszy.

Przedstawienie wyników jest analogiczne do wcześniejszego punktu pracy, a same dane również wskazują na poprawność przygotowania metody. Na wyróżnienie zasługuje bardzo staranna analiza merytoryczna uzyskanych wyników walidacji i poprawne wyciągnięcie wniosków, co zostało przedstawione w sposób spójny i czytelny w postaci krótkiego podsumowania na końcu sekcji 4.1. Wyniki walidacji wszystkich metod spełniają ogólnie przyjęte kryteria i charakteryzują się szerokim zakresem liniowości i niską granicą oznaczalności. Jedynym wskazanym przez Autorkę punktem metody niespełniającym wspomnianych kryteriów jest znaczący efekt matrycy występujący w przypadku próbek rzeczywistych. Takie zjawisko znacznie utrudnia, a niejednokrotnie uniemożliwia ilościową analizę danych. Czy Pani Magister może wskazać metody pozwalające zminimalizować efekt matrycy i skomentować wpływ tego zjawiska na otrzymane wyniki swojej pracy?

Sekcja 4.2 dotyczy opisu uzyskanych wyników doświadczeń przeprowadzonych na modelach mysich. Należy podkreślić, że choć głównym celem pracy była ocena profilu eikozanoidów w zwierzęcych modelach dysfunkcji śródbłonna naczyniowego na podstawie metod opracowanych przez Autorkę niniejszej dysertacji, jednak w celu umożliwienia przeprowadzenia poprawnej interpretacji wyników badania rozszerzono o dodatkowe oznaczenia i testy

W mysim modelu niedoboru tlenu azotu wywołanym przez L-NAME oceniono funkcję śródbłonna naczyniowego, aktywność płytek krwi, stężenie eikozanoidów powstających z udziałem COX oraz stężenie MNA i jego metabolitów. Oceniono również wpływ farmakologicznej modulacji funkcji śródbłonna naczyniowego przez MNA na mierzone mediatory u myszy z zahamowaną syntazą NO. W mysim modelu nadciśnienia tętniczego krwi wywołanym przez angiotensynę II, wykonano pomiary ciśnienia tętniczego krwi oraz oceniono rozwój dysfunkcji śródbłonna naczyniowego i stężenie eikozanoidów powstających z udziałem COX, LOX i izoenzymów CYP450. Oceniono także wpływ farmakologicznej modulacji funkcji śródbłonna naczyniowego poprzez zastosowanie dabigatranu hamującego trombinę na ciśnienie tętnicze krwi oraz stężenie eikozanoidów u myszy z nadciśnieniem tętniczym krwi. W mysim modelu przerzutującego raka sutka wywołanym inokulacją komórek nowotworowych linii 4T1 oceniono progresję choroby, rozwój ogólnoustrojowego stanu zapalnego, funkcję śródbłonna naczyniowego oraz stężenie eikozanoidów powstających z udziałem COX, LOX, izoenzymów CYP450 oraz reakcji nieenzymatycznych. W modelu tym oceniono również wpływ zahamowania syntazy NO przez L-NAME na rozwój raka sutka i jego przerzutowość oraz stężenie eikozanoidów u myszy z wywołanym nowotworem.

Mimo dużej liczby zamieszczonych rycin i tabel, co podyktowane jest bardzo dużą ilością uzyskanych danych, wprowadzona struktura i forma przedstawianych rezultatów jest czytelna i umożliwia łatwe poruszanie się czytelnika po opisywanych zagadnieniach. Każdy z fragmentów dysertacji opisujący wyniki doświadczeń przeprowadzonych na konkretnym modelu opatrzony jest syntetycznym, przedstawionym w punktach podsumowaniem najważniejszych obserwacji, które w kolejnym rozdziale są punktem wyjścia do dyskusji.

Dyskusja wyników zarówno w aspekcie analitycznym jak i biologicznym przeprowadzona została poprawnie. Autorka odniosła się do wyników opisanych w literaturze uzyskanych innymi metodami np. przy zastosowaniu ekstrakcji do fazy stałej (SPE). Punktem w tym fragmencie dyskusji którego zabrakło, a który byłby istotny ze względu na problem z efektem matrycy zaobserwowanym w wynikach walidacji, był brak informacji o większej selektywności metody SPE, co może przełożyć się właśnie na obniżenie efektu matrycy. Efekt matrycy wspomniany w kolejnym akapicie dyskusji w aspekcie matryc zastępczych, gdzie Doktorantka podkreślała trafny wybór sztucznych matryc: „Tak wysokie [%MEA] wynikały z wysokich stężeń endogennych tych eikozanoidów i doskonale uzasadniły zastosowanie sztucznych matryc, w procesie walidacji opracowanych metod, z zastosowaniem techniki UPLC-MS/MS”. Na efekt matrycy zdecydowanie wpływają nie tylko eikozanoidy będące celem analizy, ale wiele innych związków pozostających w próbce, np. fosfolipidy, które kumulują się z czasem w systemie UPLC-MS/MS wpływając negatywnie na wyniki pomiarów. Z tego właśnie względu alternatywne metody preparatyki tj. SPE mogą przyczynić się do oczyszczenia ekstraktów i obniżenia ww. efektu. Oczywiście, każda z metod ma swoje plusy i minusy i wybór konkretnej strategii musi wynikać z postawionego celu badań, lecz należy być świadomym różnic między poszczególnymi technikami. W odniesieniu do tego właśnie zagadnienia, skoro walidacja przebiegła pomyślnie dla próbek sztucznej matrycy, a wykazywała w niektórych przypadkach bardzo wysoki efekt matrycy w rzeczywistych próbkach, proszę o komentarz na ile miarodajne wg Doktorantki są wyniki oznaczeń stężeń w próbkach biologicznych i czy np. możliwym jest, że część obserwowanej zmiany poziomu eikozanoidów jest wynikiem efektu matrycy? Z kolei bardzo trafnym było wyjaśnienie zastosowanego podejścia w odniesieniu do analizy formy zestryfikowanej, wolnej i stężenia całkowitego badanej grupy związków. Jeśli chodzi o stabilność eikozanoidów, to oczywiście była ona oceniana w ekstraktach. Ich niestabilność natomiast, może manifestować się już na początku procesu analitycznego czyli w momencie pobrania i preparatyki. Ponieważ w metodyce opisującej ten etap prac nie ma odniesienia do literatury, która zawierałaby także informacje na temat ewentualnego rozkładu pewnych związków z badanej grupy proszę o komentarz czy zastosowana strategia prezerwacji

materiału w trakcie jego obróbki została zapożyczona z literatury czy była opracowana przez Doktorantkę. W przypadku pracy twórczej proszę skomentować czy Autorka znalazła w literaturze fachowej informacje o stabilności oznaczanych przez Nią związków np. w trakcie wirowania osocza w zastosowanych warunkach czy dobowej zbiórki moczu, homogenizacji tkanki płucnej czy preparatyki aorty.

Przedstawiona w kolejnych sekcjach dyskusji interpretacja biologiczna wiążąca uzyskane zmiany profilu eikozanoidów z mechanizmami prowadzącymi w poszczególnych modelach mysich do dysfunkcji śródbłonna była przeprowadzona w sposób merytoryczny i poparta faktami z doniesień naukowych. Autorka wykazała jak zaobserwowane zmiany poszczególnych szlaków eikozanoidów wpisują się w dotychczas poznaną wiedzę na temat uszkodzenia funkcji śródbłonna na skutek niedoboru tlenu azotu. Solidny przegląd literatury w zestawieniu z krytycznym podejściem do uzyskanych wyników pozwolił na postawienie tezy o niezależnym od COX-2 działaniu egzogenego MNA przyczyniającego się do poprawy funkcji śródbłonna naczyniowego poprzez zwiększenie biodostępności NO oraz hamowanie aktywności płytek krwi. Z kolei profilowanie eikozanoidów w mysim modelu nadciśnienia tętniczego krwi wywołanym przez angiotensynę II umożliwiło stwierdzenie poprawy funkcji śródbłonna pod wpływem zastosowanego inhibitora trombiny i wskazanie biorących w niej udział mechanizmów, a także wykluczenie wpływu tego inhibitora na ciśnienie krwi. Wartym podkreślenia jest fakt, iż wysnute wnioski były możliwe dzięki obserwacjom stężenia całkowitego pewnych eikozanoidów (HETE, EET, DHET), a poziom formy wolnej w przypadku HETE nie wykazywał podobnego trendu. W moim odczuciu, oprócz spekulacji na temat podłoża biologicznego tego zjawiska warto wziąć pod uwagę wspomniany kilkakrotnie efekt matrycy, który właśnie w przypadku HETE wykazywał duże nieprawidłowości w matrycy rzeczywistej. Ostatnim etapem dyskusji była ocena profilu eikozanoidów w mysim modelu przerzutującego raka sutka wywołanym inokulacją komórek nowotworowych linii 4T1. Ze względu na ogromną rolę procesu angiogenezy w rozwoju nowotworów oraz ich przerzutowaniu zrozumienie dokładnych mechanizmów tych zjawisk jest niezbędnym do prac nad skutecznymi metodami leczenia nowotworów. Na podstawie wyników swoich badań Pani mgr Kij powiązała towarzyszący procesowi nowotworowemu stres oksydacyjny ze zwiększoną biosyntezą 8-iso-PGF₂ α oraz stwierdziła, że zmniejszenie biodostępności NO w rozwoju raka sutka, skutkuje uruchomieniem mechanizmów angiogenezy nowotworowej zależnych przede wszystkim od EET oraz 20-HETE. Dodała, że przerzutowość nowotworowa w modelu 4T1, może być w dużym stopniu regulowana przez HETE powstające z udziałem lipooksygenaz.

Przedstawiona praca jest bardzo interdyscyplinarna, badania zaplanowano w sposób przemyślany, wyniki przedstawiono w sposób jasny i precyzyjny, a dyskusja jest merytoryczna i oparta na odpowiednio dobranych pozycjach literaturowych, głównie anglojęzycznych, z ostatnich kilku lat.

Biorąc pod uwagę wcześniejsze stwierdzenie zawarte we "wstępie", o rozwoju "eikozanomiki" czy Doktorantka uważa że takie globalne podejście do eikozanoidów w opisanych w dysertacji aplikacjach pozwoliłoby na uzyskanie pełniejszych i bardziej informatywnych wyników czy dobrane zestawy celowanych związków w pełni umożliwiły osiągnąć założone cele pracy? Czy Doktorantka planuje kontynuację badań i rozszerzenie analiz o kolejne związki zmierzając właśnie w kierunku eikozanomiki? W pracy nie analizowano regio- i stereoizomerów. Czy wg Pani Magister takie informacje mogłyby istotnie przyczynić się do zrozumienia pewnych procesów fizjo- i patologicznych?

W przedstawionej do recenzji pracy zakres badań jest imponujący, od opracowania metodyki przez prowadzenie hodowli komórkowych do badań na trzech różnych modelach in vivo. Ze względu na fakt, że praca jest w formie monografii i nie zawiera, jak to jest w przypadku cyklu, oświadczeń współautorów, trudno jest ocenić które elementy oprócz opracowania i analiz UPLC-MS/MS zostały przeprowadzone przez Doktorantkę. Samo opracowanie wspomnianej metodyki i zastosowanie jej do analizy próbek samo w sobie stanowi ogrom pracy, niemniej dobrze widzianym byłoby podanie informacji (np. w miejscu opisu poszczególnych metod) o zaangażowaniu/pomocy pozostałych badaczy.

Podsumowanie

Osiągnięcie jako całość można określić jako nowatorskie i interdyscyplinarne, a tym samym świadczące o dużej dojrzałości naukowej Doktorantki. Podkreślić należy fakt bardzo owocnej współpracy międzynarodowej, która pozwoliła na przeprowadzenie nowatorskich badań prowadzących do ciekawych obserwacji naukowych. Podjęty temat profilowania eikozanoidów jest bardzo trudnym z punktu widzenia analitycznego i biologicznego, co tym bardziej zasługuje na docenienie, iż Doktorantka znakomicie poradziła sobie z tak ambitnym zadaniem. Udział eikozanoidów w wielu procesach leżących u podstaw fizjologii i patologii otwiera szerokie pole do opisu Doktorantce w dalszych projektach badawczych.

Na podstawie przedstawionej rozprawy doktorskiej stwierdzam, że w pełni spełnia ona wymogi merytoryczne i formalne stawiane dysertacjom doktorskim i określone w art. 13 ustawy z dnia 14 marca 2003 roku i stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2016 poz. 882 z późn. Zm.). Niniejszym, zwracam się do Wysokiej Rady Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum z wnioskiem o dopuszczenie Pani mgr Agnieszki Kij do dalszych etapów postępowania w ubieganiu się o stopień naukowy doktora. Ponadto, biorąc pod uwagę wysoki poziom przedstawionej dysertacji zwracam się do Wysokiej Rady Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum z wnioskiem o wyróżnienie rozprawy (wniosek załączam w osobnym piśmie).

Łączę wyrazy szacunku,



Dr hab. n. farm. Barbara Bojko