



WYDZIAŁ BIOCHEMII, BIOFIZYKI I BIOTECHNOLOGII
ZAKŁAD BIOFIZYKI MOLEKULARNEJ
PROF. DR HAB. ARTUR OSYCZKA

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Adrianny Budzińskiej pt „Wpływ bifosfonianów stosowanych w terapii osteoporozy na metabolizm tlenowy komórek śródbłónka”

W przedstawionej mi do recenzji pracy doktorskiej Pani mgr Adrianny Budzińskiej opisany został ciąg badań mających na celu zanalizowanie wpływu bifosfonianów zawierających azot (N-BPs) na metabolizm tlenowy komórek śródbłónka naczyń krwionośnych. Związki te są powszechnie stosowane w terapii osteoporozy jako leki zmniejszające resorpcję kości a ich działanie polega na blokowaniu enzymu w szlaku mewalonowym, co przekłada się na wpływ na procesy takie jak synteza cząsteczek zawierających jednostki izoprenoidowe, w tym hemów czy koenzymu Q (CoQ), wiążąc się z szeregiem potencjalnych skutków ubocznych. Tym właśnie zagadnieniom poświęcona jest praca doktorska Pani Budzińskiej, co biorąc pod uwagę powszechność stosowania związków jako leków i znaczenie fizjologiczne procesów na które mogą wpływać, jest zagadnieniem bardzo aktualnym i istotnym zarówno z poznawczego jak i medycznego punktu widzenia.

W ogólnym zarysie, doktorantka przebadła na poziomie komórkowym i mitochondrialnym wpływ dwóch związków NBPs: alendronianu i zoledronianu na metabolizm energetyczny, stres oksydacyjny i funkcjonowanie mitochondriów, używając jako materiału badawczego ludzkie komórki śródbłónka EA.hy926. Uzyskane wyniki ujawniły wpływ tych związków na szereg istotnych procesów komórkowych i na organizację makromolekularną obejmujących m.in. zmiany w puli CoQ, poziomie zredukowanego CoQ, poziomie ATP, RTF, zmiany dynamiki mitochondriów, adaptacji metabolizmu tlenowego. Zidentyfikowanie i opisanie tak szerokiego obszaru zmian wywołanych tymi związkami jest istotne nie tylko z poznawczego punktu widzenia, poszerzając naszą wiedzę na temat metabolizmu komórkowego, ale również z perspektywy medycznej, dostarczając informacji, które mogą zostać wykorzystywane w terapiach z użyciem NBPs. W ocenie recenzenta jest to najistotniejsze osiągnięcie pracy.

Praca ma charakter zbioru trzech tematycznie powiązanych prac (2 eksperymentalnych opublikowanych w czasopiśmie *Scientific Reports* oraz 1 przeglądowej w recenzji w czasopiśmie *Pharmaceuticals*) zaopatrzonych streszczeniem w języku polskim i angielskim oraz dodatkowymi rozdziałami zatytułowanymi: wprowadzenie, cele pracy, wyniki oraz podsumowanie wyników i wnioski. We wszystkich trzech pracach stanowiących podstawę pracy doktorskiej Pani Budzińska jest

pierwszą autorką, a zamieszczone oświadczenia autorki i pozostałych współautorów wskazują na znaczący wkład doktorantki w powstanie tych artykułów. Na końcu rozprawy znajduje się lista 6-ściu publikacji, które nie wchodzą w skład rozprawy doktorskiej, gdzie doktorantka jest współautorem. Prace te tematycznie powiązane są z zagadnieniami poruszonymi w rozprawie doktorskiej świadcząc o szerokiej aktywności naukowej doktorantki w przedmiotowej dziedzinie.

Rozdziały uzupełniające w zwięzły i treściwy sposób omawiają podjęte zagadnienie badawcze, uzyskane wyniki i wypływające z nich wnioski. Rozdział wyniki podzielony jest na 3 podrozdziały, z których każdy podsumowuje osobno zawartość opublikowanych prac. Ta część rozprawy zaopatrzona jest na końcu schematem zestawiającym najważniejsze wyniki opisane w opublikowanych pracach eksperymentalnych tj, zidentyfikowane efekty wpływu N-BPs na komórki śródbłonna zarówno na poziomie komórkowym jak i mitochondrialnym.

Część wprowadzającą i opisującą opublikowane prace czyta się z dużym zainteresowaniem. Jest ona napisana w sposób umożliwiający zrozumienie tematu nawet przez osobę niebędącą specjalistą w dziedzinie. Jest to możliwe m.in. dzięki przejrzystości i logiczności formułowanych myśli i wniosków i umiejętnym zestawianiu poszczególnych aspektów wielowątkowej analizy, co razem wzięte, świadczy o dużej dojrzałości naukowej doktorantki. Do tej części pracy mam parę drobnych uwag:

- dodatkowym ułatwieniem w czytaniu tekstu byłoby zamieszczenie rysunków/schematów ilustrujących model badawczy, czy diskutowane mechanizmy, w tym kontekście niezmiernie wartościowy jest schemat ze str 27. Jest to jednak jedyny schemat podsumowujący wyniki, ale zastanawiam się czy można było pokusić się o rysunki odnoszące się do wcześniejszych etapów wprowadzenia;
- doktorantka w pracy skupiła się na opisie działania N-BPs w odniesieniu do komórek śródbłonna, co jest zrozumiałe ze względu zastosowany model badawczy, niemniej jednak w części wprowadzającej zabrakło mi bardziej szczegółowego opisu jak te związki wpływają na metabolizm innych typów komórek, w tym zwłaszcza osteoklastów, które wydają się być komórkami docelowymi dla tych związków w stosowanych terapiach osteoporozy;
- przydałoby się szersze wyjaśnienie dotyczące skrótu CoQ10B na stronie 15 (lub/i odnośnik literaturowy);
- choć część wprowadzająca zajmuje niecałe 30 stron, przydatny byłby wykaz stosowanych skrótów;

-wydaje się również, że spis literaturowy zamieszczony we wprowadzeniu mógł być nieco bardziej rozbudowany (jest to jedynie 9 pozycji).

Lektura rozprawy doktorskiej nasunęła mi następujące spostrzeżenia i komentarze do dalszej dyskusji:

-Czemu w przeprowadzonych badaniach przetestowano jedynie okres 6-ściu dni inkubacji? Czy można było pokusić się o przetestowanie zależności efektów od czasu inkubacji.

-Czy jednym z efektów działania NBPów w komórkach mogłoby być zachodzenie RET (z ang. reverse electron transfer) co wiązałoby się z podniesionym poziomem RFT? Mam tu na myśli proces, w którym w warunkach wysokiego potencjału błonowego i wysokiego poziomu zredukowania CoQ frakcja elektronów z puli CoQ może „cofnąć się” na powrót do kompleksu I.

- Jakie mechanizmy molekularne mogłyby być odpowiedzialne za zwiększoną produkcję RFT w komórkach traktowanych N-BPami? Czy i w jaki sposób możemy to powiązać ze zmianami w puli Q i poziomem redukcji Q?

- Czy zaobserwowane efekty N-BPów w komórkach śródbłonnka mogą zdaniem doktorantki mieć również odniesienie do innych typów komórek, w tym zwłaszcza osteoklastów. Czy prowadzone były badania na ten temat, czy dostępne są może informacje literaturowe na ten temat. W metabolizmie osteoklastów jak i większości innych typów komórek istotną rolę pełnią mitochondria, zatem można się zastanawiać na ile wyniki uzyskane w pracy dla mitochondriów z komórek śródbłonnka mogłyby być uogólnione dla mitochondriów innych typów komórek.

-W nawiązaniu do poprzedniego punktu: Doktorantka postuluje, że: „obniżenie produkcji ATP i zaburzenie funkcjonowania łańcucha oddechowego mogą być istotnym elementem cytotoksycznego działania N-BPów na komórki śródbłonnka” (str 27 rozprawy). Czy, a jeśli tak to na ile, zdaniem doktorantki, to sformułowanie można uogólnić postulując cytotoksyczne działanie N-BPów na komórki w ogóle.

-W związku z postulowaną cytotoksycznością N-BPów nasuwa się kolejne pytanie: Czy w oparciu o uzyskane wyniki badań można zasugerować modyfikacje do prowadzonych obecnie terapii lekami N-BPami by minimalizować skutki uboczne?

- Na str 12 czytamy że „zwiększony poziom tlenu, prawdopodobnie w wyniku obniżenia zużycia tlenu przez metabolizm tlenowy ...” po czym w następnym zdaniu „Przeprowadzona analiza enzymów syntazy cytrynianowej oraz kompleksu IV wykazała wzrost aktywności jak i poziomu obu enzymów

świadczący o zwiększonej pojemności oddechowej cyklu Krebsa i łańcucha oddechowego” ---- jak należy rozumieć te dwa wnioski, by nie wykluczały się wzajemnie?

- W schematycznym zestawieniu na str 27 w kolumnie dotyczącej poziomu mitochondrialnego punkty 1-szy i 5-ty zdają się wykluczać wzajemnie (w 1-szym punkcie mamy utratę mtCoQH₂ a 5-tym wzrost poziomu redukcji mtCoQ)?

Opinia końcowa:

Formułując konkluzję stwierdzam, że Pani mgr Adrianna Budzińska przedstawiła niezwykle ciekawą rozprawę doktorską. Wyniki i ich interpretacja są nowatorskie i przyczyniają się znacząco do poszerzenia naszej wiedzy na temat zmian w metabolizmie tlenowym komórek śródbłonna i aktywności bioenergetycznej mitochondriów tych komórek eksponowanych na działanie związków stosowanych jako leki w leczeniu osteoporozy .

Mając na względzie przedstawioną powyżej opinię, uważam że prezentowana rozprawa doktorska spełnia wszystkie warunki do uzyskania stopnia doktora nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne. Walory samej rozprawy, w szczególności naukowa waga osiągniętych w jej ramach wyników i proponowanych mechanizmów sprawiają, że rozprawę doktorską postrzegam jako wyróżniającą. Gratulując Autorce pracy oraz Pani Promotor wartościowej pracy doktorskiej zwracam się z prośbą do Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu o dopuszczenie mgr Adrianny Budzińskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.