



Gdańsk, 20 września 2018

Prof. dr hab. med. Przemysław Wojtaszek
Dziekan Wydziału Biologii
Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu

Recenzja pracy doktorskiej mgr Izabeli Broniarek pt. „Wpływ kwasów tłuszczowych i statyn na metabolizm tlenowy komórek śródbłónka”.

Komórki śródbłónka tworzą najbardziej wewnętrzną warstwę naczyń krwionośnych i limfatycznych pozostającą w bezpośrednim kontakcie z krwią. Stąd wynika strategiczne znaczenie tych komórek dla funkcji całego organizmu. Komórki te kontrolują przepływ substratów metabolicznych w tym tlenu pomiędzy światłem naczynia a komórkami narządów takich jak serce, mózg, wątroba czy nerka. Komórki te kontrolują procesy krzepnięcia krwi oraz reakcji immunologicznych. Pełnią również szczególną rolę w regulacji przepływu krwi w narządach oraz w procesie angiogenezy. Procesy te są możliwe dzięki unikalnej charakterystyce strukturalnej, metabolicznej i regulacyjnej komórek śródbłónka. Z jednej strony na powierzchni komórek śródbłónka obecny jest zespół receptorów odpowiadających na bodźce chemiczne czy mechaniczne. Z drugiej komórki śródbłónka produkują wiele substancji o charakterze regulacyjnym, z których najbardziej znany jest tlenek azotu dyfundujący do komórek mięśniówki gładkiej gdzie poprzez aktywację produkcji cGMP powoduje rozkurcz i zwiększenie przepływu krwi. Komórki śródbłónka są istotne w odpowiedzi immunologicznej organizmu kontrolując przyleganie białych krwinek i ich przejście do przestrzeni pozanaczyniowej. Odbywa się to poprzez produkcję i transport na powierzchnię błony komórki śródbłónka specyficznych białek adhezyjnych.

Komórki śródbłónka odgrywają fundamentalną rolę w wielu patologiach, przede wszystkim naczyniowych takich jak miażdżyca lecz również w chorobie nowotworowej. Stąd zrozumienie funkcji tych komórek jest tak istotne. Tradycyjne spojrzenie na metabolizm energetyczny tych komórek zakłada główną rolę glikolizy jako źródła energii, co wydaje się optymalne ze względu na praktycznie nieograniczony dostęp do glukozy oraz łatwość w usuwaniu mleczanu. Zwiększa to również ilość tlenu dostarczanego do komórek narządów. Mimo tego od dawna wiadomo, że komórki śródbłónka posiadają mitochondria których wprawdzie jest mniej niż w neuronach, kardiomiocytach czy hepatocytach lecz ich znaczenie może być kluczowe, nie tyle dla utrzymania równowagi energetycznej lecz dla funkcji które te komórki pełnią w całym narządzie w tym przede wszystkim regulacyjnych. Mitochondria w śródbłónku mogą również przyczyniać się do uszkodzenia tych komórek poprzez generowanie wolnych rodników które są szczególnie toksyczne dla komórek śródbłónka.



Dlatego badania dotyczące wpływu czynników metabolicznych i farmakologicznych ze szczególnym uwzględnieniem funkcji mitochondriów w komórkach śródbłónka są bardzo ważne zarówno z punktu widzenia badań podstawowych jak i ze względów praktycznych.

Badania podjęte przez doktorantkę dotyczyły wpływu ekspozycji komórek śródbłónka linii EA.hy926 na kwasy tłuszczowe oraz krótkotrwałe i długotrwałe działanie statyn zarówno z tych z grupy hydrofilowych jak i hydrofobowych.

W swych badaniach doktoranta stosowała techniki hodowli komórkowych, izolowała mitochondria, dokonywała pomiarów zużycia tlenu na poziomie komórek i izolowanych mitochondriów z zastosowaniem elektrody tlenowej, prowadziła pomiary mitochondrialnego potencjału błonowego z zastosowaniem sondy fluorescencyjnej JC1. Ponadto były wykonywane pomiary produkcji reaktywnych form tlenu z zastosowaniem testów z NBT, MitoSOX, CM-H₂_DCFDA oraz Amplex Red. Wykonywane były również pomiary aktywności enzymów, takich jak syntaza cytrynianowa, oksydaza cytochromu C oraz dehydrogenaza mleczanowa. Doktorantka analizowała też zawartość koenzymu Q10 w komórkach z zastosowaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej oraz stosowano technikę Western blot do pomiaru zawartości wybranych białek.

Wyniki pracy pokazały, że długotrwała ekspozycja na podwyższone stężenie kwasu palmitynowego wywołuje obniżenie żywotności i liczebności komórek śródbłónka. Towarzyszy temu przesunięcie komórkowego metabolizmu w stronę utleniania kwasów tłuszczowych. Zaobserwowano także nieprawidłowości w funkcjonowaniu mitochondrialnego łańcucha oddechowego oraz wzrost mitochondrialnej i niemitochondrialnej produkcji reaktywnych form tlenu.

Analiza bezpośredniego wpływu statyn na izolowane mitochondria śródbłónka wykazała, że hydrofilowa prawastatyna nie zmienia istotnie metabolizmu tlenowego mitochondriów. Natomiast hydrofobowa atorwastatyna zaburza funkcjonowanie łańcucha oddechowego, na co składają się rozprężanie, a w wyższych stężeniach, inhibicja fosforylacji oksydacyjnej. Wykazano, że zmiany wywołane przez atorwastatynę miały związek z jonami wapnia zawartymi w cząsteczce tej statyny. Atorwastatyna wywoływała też wzrost produkcji nadtlenu wodoru w mitochondriach.

Badania poświęcone długotrwałemu wpływowi statyn na komórki śródbłónka wykazały, że traktowanie prawastatyną lub atorwastatyną powoduje obniżenie tlenowego oddychania komórkowego przy niezmienionym utlenianiu kwasów tłuszczowych. Nie było to kompensowane przez wzrost aktywności glikolizy beztlenowej. Ponadto, atorwastatyna indukowała znaczący wzrost produkcji reaktywnych form tlenu w komórkach śródbłónka. W wyniku ekspozycji komórek na statyny następowało obniżenie stężenia koenzymu Q10.



Zaobserwowane zmiany pozwalają stwierdzić, że hydrofobowa atorwastatyna działa na komórki śródbłónka silniej i w bardziej szkodliwy sposób niż hydrofilowa prawastatyna. Długotrwała ekspozycja na statyny w stężeniach występujących fizjologicznie, wpływa znacząco, choć nie drastycznie, na metabolizm tlenowy komórek śródbłónka. Wydaje się, że obniżenie stężenia koenzymu Q10 nie w pełni tłumaczy zaobserwowane zmiany, dlatego też potrzebne są dalsze badania by wyjaśnić ich przyczyny.

Najważniejsze wnioski końcowe płynące z tych badań to podkreślenie roli mitochondriów w odpowiedzi komórek śródbłónka na podwyższone stężenie kwasów tłuszczowych i statyn oraz związane z tym zmiany metaboliczne w tym zwiększona produkcja reaktywnych form tlenu. Hydrofobowe statyny powodowały silniejsze zaburzenia funkcjonowania mitochondriów i przy długotrwałej ekspozycji spadek stężenia Q10 może być odpowiedzialny za te zaburzenia.

Wyniki te były dla mnie niezwykle interesujące, gdyż badania prowadzone w Gdańsku dotyczące wpływu statyn (konkretnie atorwastatyny) na przemiany nukleotydów wykazały, że atorwastatyna powoduje postępujący spadek stężenia ATP w hodowanych komórkach śródbłónka HMEC-1 co jest spójne z wynikami badań przedstawianych w doktoracie.

Jestem jednak trochę sceptyczny czy faktycznie zaburzenia funkcji mitochondriów powodują zaburzenie równowagi energetycznej w komórkach śródbłónka. W moich innych badaniach inkubacja komórek śródbłónka bez tlenu nie powodowała spadku stężenia ATP ani wzrostu produkcji katabolitów purynowych.

Nie jest do końca dla mnie jasne na jakiej podstawie różnicowano efekty statyn zależne i niezależne od hamowania szlaku kwasu mewalonowego. Czy wykonano eksperymenty z podawaniem tego kwasu?

Mam pytanie dotyczące eksperymentów analizujących wpływ kwasu palmitynowego na komórki śródbłónka. Czy po dodaniu podanego stężenia kwasu palmitynowego do pożywki sprawdzono jakie było końcowe stężenie wolnych kwasów tłuszczowych? Ponieważ w pożywce jest 10% FBS który zawiera z pewnością kwasy tłuszczowe, końcowe stężenie mogło być inne niż zakładano.

Ze względu na to że zastosowano tylko jeden typu linii komórkowej hodowanej *ex vivo*, z pewną ostrożnością należy się odnosić do przenoszenia uzyskanych wyników do układu *in vivo* i do pacjentów leczonych statynami. Zarówno prawastatyna jak i atorwastatyna są powszechnie stosowane w zapobieganiu i leczeniu zaburzeń lipidowych i miażdżycy. W badaniach klinicznych i codziennej praktyce nie wykazano tak jednoznacznej różnicy. Na pewno wyniki pracy sugerują dokładniejszą analizę, jednak jest też możliwe, że czynniki *in*



vivo których nie można odtworzyć w hodowlach komórkowych modyfikują efekty obserwowane w pracy. Problem ten został tylko zasygnalizowany w dyskusji, a jego szersze omówienie było by wartościowe. Autorka pracy wspomina wielokrotnie o dalszych koniecznych badaniach i warto by zasugerować jakie to konkretne powinny być badania.

Pod względem redakcyjnym praca jest napisana wzorcowo i niewiele można zgłosić uwag krytycznych. Moim zdaniem jednak we wstępie lepiej było by zacząć od opisu funkcji śródbłonna i jego znaczenia w patologii, a dopiero w dalszej części można by omówić budowę i funkcję mitochondrium przechodząc od ogółu do szczegółu.

Zauważyłem kilka błędów literowych, np. brakuje a w tytule rozdz. 3.4.3

Niektóre sformułowania są niezbyt fortunne, np. jony wapnia zawarte w cząsteczce atorwastatyny (w streszczeniu). Powinno być jonami wapnia obecnymi w preparacie lub związanymi z cząsteczką atorwastatyny.

W opisie warunków rozdziału (str. 39) jest rozbieżność. W tekście jest, że fazę ruchomą była mieszanina metanol:etanol (1:1) a opisie ryciny 12 jest metanol:etanol (2:3).

Wymienione uwagi do ocenianej przeze mnie pracy w żadnej mierze nie umniejszają jej bardzo wysokiej wartości naukowej oraz praktycznej. Praca stanowi bardzo znaczący wkład w badania nad czynnikami wpływającymi na metabolizm śródbłonna. Na pewno trzeba dokładniej analizować efekty uszkodzenia śródbłonna w trakcie podawania statyn i być może powinno się przy ich podawaniu uzupełniać Q10 egzogennie. Większość wyników doktoratu już została opublikowana w bardzo dobrych czasopismach, a pozostała część też z pewnością zostanie dobrze opublikowana. Oceniana praca spełnia wszystkie kryteria stawiane rozprawie doktorskiej.

Wnoszę do Wysokiej Rady Wydziału Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu o dopuszczenie mgr Izabeli Broniarek do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ponadto, biorąc pod uwagę wyjątkowo wysoką wartość naukową recenzowanej pracy doktorskiej oraz wartościowe publikacje już powstałe na jej podstawie składam dodatkowy wniosek o wyróżnienie jej Autora.

Z poważaniem

KIEROWNIK
Katedry i Zakładu Biochemii
Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

prof. dr hab. *Ryszard Tomasz Smoleński*