

Kraków, 27 listopada 2016

**OCENA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ mgr Agnieszki Koziol**

**p.t. „Aerobic metabolism of human endothelial cells under physiological and pathophysiological conditions”** wykonanej w Zakładzie Bioenergetyki Instytutu Biologii Molekularnej i Biotechnologii Wydziału Biologii Uniwersytetu Adama Mickiewicza w Poznaniu pod promotorską opieką Pani Prof. dr hab. Wiesławy Jarmuszkiewicz

Dysfunkcja śródbłonna, której istotnych wyznacznikiem jest upośledzenie wytwarzania śródbłonkowego NO oraz stres oksydacyjny śródbłonna i ściany naczyń krwionośnego odgrywają istotną rolę w patogenezie chorób układu krążenia. W szczególności, dysfunkcja śródbłonna ma znaczenie diagnostyczne, prognostyczne i terapeutyczne w miażdżycy i jej powikłaniach naczyniowych, takich jak zawał mięśnia sercowego, udar mózgu i choroby naczyń obwodowych. Pomimo wielu badań nad mechanizmami dysfunkcji śródbłonna, wciąż nie poznane są mechanizmy mitochondrialne regulujące czynność śródbłonna. Ogólnie znany jest fakt, że głównym źródłem ATP w komórkach śródbłonna jest glikoliza tlenowa. Pomimo jednak rosnącej ostatnio literatury na temat metabolizmu śródbłonna nie ma jak dotąd jasności w jakich warunkach fizjologicznych czy patofizjologicznych oddychanie mitochondrialne stanowi istotne źródło ATP dla śródbłonna, jak również jakie mechanizmy mitochondriów śródbłonna odpowiedzialne są za uruchomienie szlaków sygnalizacyjnych w śródbłonku, prowadzących do ochrony śródbłonna przed jego uszkodzeniem, a jakie do rozwoju dysfunkcji śródbłonna. Praca doktorska Pani mgr. Agnieszki Koziol, wpisuje się w ten nurt badań na mechanizmami mitochondrialnymi regulacji czynności śródbłonna i stanowi jego ważne uzupełnienie. Doktorantka wykorzystując izolowane mitochondria śródbłonna lub też całe komórki śródbłonna (Ea.hy.926) postawiła sobie następujące cele pracy: 1/ szczegółowe zcharakteryzowanie czynności mitochondriów i oddychania mitochondrialnego w komórkach śródbłonna (Ea.hy.926). 2/ zbadanie wpływu chronicznej hyperglikemii na oddychanie mitochondrialne śródbłonna, 3/ zbadanie czynności śródbłonkowego mitochondrialnego białka UCP-2 oraz wpływu chronicznej hyperglikemii na czynność UCP-2 4/ zbadanie wpływu przewlekłej hipoksji na oddychanie mitochondrialne śródbłonna oraz w końcu 5/ zcharakteryzowanie kanału wewnętrznej błony mitochondrialnej, kanału mitoBKCa.

Rozprawa doktorska jest napisana w języku angielsku i zawiera 149 stron. Rozprawa obejmuje streszczenie, spis treści, listę skrótów, wstęp, cel pracy, materiał i metody, wyniki wraz z dyskusją (podzielone na kilka części), podsumowanie dyskusji, streszczenie po polsku, listę publikacji doktorantki, oraz bibliografię. Układ rozprawy w zasadzie, nie odbiega więc od przyjętych standardów.

W obszernym 40 stronicowym Wstępie doktorantka szeroko przedstawia podstawowe wiadomości na temat mitochondriów, w tym o strukturze mitochondriów, genomie mitochondrialnym, czynności mitochondriów w tym o mechanizmach fosforylacji oksydacyjnej, Autorka opisuje również rolę mitochondriów w regulacji hemostazy wapniowej komórki, w wytwarzaniu wolnych rodników tlenowych (ROS) przez łańcuch oddechowy, mechanizmy antyoksydacyjne mitochondriów, mechanizmy regulujące wytwarzanie ROS przez łańcuch mitochondrialny oraz w końcu niemitochondrialne źródła ROS (NOX, XOR, LOX). Kolejne rozdziały dotyczą mitochondriów śródbłonka w tym zaburzeń czynności mitochondriów śródbłonka w cukrzycy, w chorobach układu krążenia. Jest również podrozdział dotyczący białek UCP, i ich roli np. w ograniczaniu wytwarzania ROS, jak również podrozdział opisujący odpowiedź mitochondriów na niedotlenienie. Ostatni rozdział wstępu dotyczy kanałów potasowych w śródbłonku.

W sumie Wstęp zawiera wiele cennych informacji i świadczy o dużej wiedzy doktorantki. Jednak w opinii recenzenta wątki z zakresu ogólnej wiedzy bioenergetycznej oraz te specyficznie dotyczące śródbłonka są niejednokrotnie wymieszane i przez to wstęp nie najlepiej przedstawia wiedzę dotyczącą roli mitochondriów w śródbłonku, a to przecież stanowi przedmiot badań doktorantki.

Dla przykładu gdy mowa o niemitochondrialnych źródłach ROS, mowa jest o NOX, XOR i LOX, a opisane są w rozdziale w części ogólnej wstępu, przed rozdziałem dotyczącym mitochondriów śródbłonka. Nie ma więc informacji na temach innych źródeł ROS, które mają ogromne znaczenie w patofizjologii dysfunkcji śródbłonka, takich jak wytwarzanie ROS przez rozsprzężoną syntazę NOS. Według wiedzy recenzenta generacja ROS przez LOX, ma dużo mniejsze znaczenie w śródbłonku, niż w innych komórkach. Z kolei, dwa inne enzymy śródbłonkowe metabolizujące kwas arachidonowy wydają się być istotniejsze w śródbłonku, niż LOX, a mowa o cyklooksygenazie (COX) i epoksygenazie zależnej od cytochromu P<sub>450</sub>.

Podobnie niefortunna zdaniem recenzenta jest część wstępu gdy mowa o wpływie niedotlenienia na mitochondria na inne komórki, podczas gdy doktorantka w rozprawie doktorskiej badała wpływ niedotlenienia na komórki śródbłonka. Śródbłonek jest dość oporny na niedotlenienie w przeciwieństwie

do innych komórek, i opisywane mechanizmy w większości wypadków nie dotyczą śródłonka, które głównie korzystają z glikolizy tlenowej a nie z fosforylacji oksydacyjnej. Po kilkunastu stronach tekstu na temat wpływu hipoksji na komórki, na niecałej stronie umieszczone są informacje na temat wpływu niedotlenienia na czynność mitochondriów śródłonka. Zdaniem recenzenta Autorka powinna bardziej krytycznie dokonać doboru zagadnień opisywanych we wstępie, tak żeby on stanowił dobre wprowadzenie do przedmiotu badań rozprawy doktorskiej i wyjaśnił przesłanki, które skłoniły doktorantkę do podjęcia badań jej rozprawy doktorskiej. Domyślam się, że zamysł doktorantki był taki, żeby najpierw przedstawić zarys wiedzy o mitochondriach, a potem skupić się na mitochondriach śródłonka. Osobiście wolałbym krótszy wstęp, który skupiałby się na tym co wiadomo o mitochondriach śródłonka, a ogólną wiedzę o mitochondriach znaną wszystkim, pominął, lub odnosił się do niej tylko w kontekście opisywania wiedzy dotyczącej mitochondriów śródłonka. W obecnej formie wątki dotyczące mechanizmów mitochondrialnych śródłonka z tym znanymi dla innych komórek nie są jasno odgraniczone i są nieco wymieszane.

W przeciwieństwie do wstępu, recenzent nie ma zastrzeżeń do celu pracy, który jest sformułowany jasno, i podzielony na pięć dobrze wydzielonych zagadnień, które przytoczyłem powyżej. Aby osiągnąć zaplanowany cel pracy, doktorantka posłużyła się właściwie dobranymi metodami, które bardzo dobrze opisuje na kilkunastu stronach rozdziału „Materiały i Metody”. Szczegółowy opis metod świadczy o dobrej znajomości warsztatu metodycznego przez doktorantkę. Metodyka rozprawy doktorskiej obejmuje badania oddychania mitochondrialnego na całym komórkach śródłonka, oraz na izolowanych mitochondriach z komórek śródłonka, co stanowi bezsprzecznie duże osiągnięcie doktorantki biorąc po uwagę niewielką liczbę mitochondriów w śródłonku w porównaniu do hepatocytów czy kardiomiocytów, szeroko stosowanych komórek do badań bioenergetycznych. Badania oddychania mitochondrialnego są uzupełnione innymi dobrze dobranymi metodami biochemicznymi. Recenzent miał jedynie zastrzeżenia co do zastosowania NBT jako metody oceny wytwarzania  $O_2^-$ .

Najobszerniejszą częścią rozprawy doktorskiej są Wyniki, które przedstawione razem z dyskusją obejmują 56 stron rozprawy. Wyniki przedstawione są na 33 rycinach i w dwóch tabelach. Sposób przedstawienia wyników, ich opis nie wzbudza zastrzeżeń recenzenta. Rozprawa zawiera wiele ciekawych i oryginalnych wyników. Recenzent odniesie się jedynie do wybranych z nich.

Autorka wykazała że w przewlekła hiperglikemia wywołuje przestrojenie metabolizmu mitochondriów śródłonka z glukozy, na kwasy tłuszczowe, czemu towarzyszy zwiększona ekspresja

dehydrogenazy acetyl-CoA (ACADS), i zmniejszenie ekspresji podjednostki dehydrogenazy pirogronianowej (E3BP) wskazując na przestrojenie metaboliczne śródbłonka i jak wykazuje Autorka nie towarzyszy temu zaburzenie integralności łańcucha oddechowego, czynności cyklu Krebsa, czy zmiany w biogenezie mitochondriów. Przestrojeniu metabolicznemu śródbłonka poddanemu chronicznej hiperglikemii towarzyszy natomiast zwiększona aktywność UCP-2, zwiększone wytwarzanie ROS oraz zwiększona aktywność SOD2. Autorka wykazała również, że metabolizm glutaminy w stosunku to pirogronianu jest zwiększony, jednak nie poświęca tej ciekawej obserwacji zbyt wiele miejsca, koncentrując się raczej na innych znaleziskach swojej pracy. Tymczasem, glutamina jest bardzo ważnym substratem dla metabolizmu śródbłonka i szybkość katabolizmu glutaminy w śródbłonku przewyższa aktywność metabolizmu glutaminy w innych komórkach (*G.Wu et al., 2000, Comp.Biochem. Physiol. Part A 126, 115-123*). Recenzent jest więc ciekawy jakie mogłoby być znaczenie przestrojenia metabolizmu w kierunku glutaminy, która na drodze metabolizmu do alfa-ketoglutaranu stanowi istotne anaplerotyczne źródło dla cyklu Krebsa. Recenzent byłby również ciekawy, jakie może być znaczenie niemal dwukrotnie zwiększonej ekspresji dehydrogenazy mleczanowej (LDH). Czy jest to bezpośredni skutek ograniczenia aktywności dehydrogenazy pirogronianowej? Jaki jest mechanizm i znaczenie tego zjawiska w kontekście hiperglikemii? Autorka opisuje wzrost aktywności heksokinazy pierwszej (HK1), pierwszego enzymu glikolizy, ale nie wiele poświęca zbyt wiele uwagi aby to ciekawe znalezisko wyjaśnić. Czy może być to związane z translokacją HK1 do mitochondriów co opisywano jako mechanizm cytoprotekcyjny? Czy zwiększona aktywność HK1, jest raczej związana z aktywacją cyklu pentozowego, który dostarczając NADPH pełni bardzo ważną rolę w komórkach śródbłonka narażonych na zwiększone wytwarzanie ROS? Bardzo ciekawym znaleziskiem doktorantki jest również to, że nadekspresja UCP2 w śródbłonku pod wpływem chronicznej hiperglikemii ma znaczenie ochronne, bo zmniejsza generację ROS, reguluje ekspresję ICAM-1, i zwiększa oporność śródbłonka na uszkodzenie. Recenzent ciekaw byłby czy Autorka sądzi, że inne interwencje lekko rozprzegające łańcuch oddechowy też osiągnęły by taki skutek, czy można go wyłącznie osiągnąć przez aktywację UCP2?

Jeszcze jedno najważniejsze pytanie nurtuje recenzenta. Hiperglikemia, oporność na insulinę i cukrzyca upośledzają znacznie czynność śródbłonka i skutkują dysfunkcją mitochondriów. Tymczasem, opisywane w rozprawie doktorskiej zmiany metabolizmu śródbłonka wywołane przez przewlekłą hiperglikemią, choć towarzyszy im zwiększone wytwarzanie ROS, mają raczej charakter kompensacyjny, a nie destrukcyjny, wyróżnia je przestrojenie w kierunku metabolizmu kwasów tłuszczowych, przy

całkowicie zachowanej integralności mitochondriów. Byłbym ciekawy krytycznego komentarza doktorantki co do relacji pomiędzy opisywanymi zjawiskami w swojej pracy doktorskiej z procesami metabolicznymi w śródbłonku towarzyszącymi rozwojowi insulino-oporności i cukrzycy opisywanymi przez innych autorów (np. aktywacja reduktazy aldozy i wytwarzanie sorbitolu, zahamowania G6PD i PPP, zahamowanie GADPH i glikolizy, aktywacja szlaku heksozaminy, aktywacja PKC) oraz co najważniejsze, odpowiedzi na pytanie przez jakie mechanizmy następuje upośledzenie czynności mitochondriów w śródbłonku w cukrzycy i dlaczego tych mechanizmów doktorantka nie obserwuje w swoich doświadczeniach.

Druga część wyników rozprawy doktorskiej doktorantka dotyczy wpływu przewlekłej 6 dniowej hipoksji na metabolizm śródbłonka. Odmiennosc odpowiedzi śródbłonka na niedotlenienie w stosunku do odpowiedzi na hiperglikemie stanowi bardzo ciekawy materiał do dyskusji. W warunkach niedotlenienia zwiększał się również poziom wytwarzania ROS, ale towarzyszył temu spadek UCP2, i wzrost aktywności kompleksu II łańcucha oddechowego. Również preferencje substratowe wyglądają zupełnie inaczej niż miało to miejsce w komórkach hiperglikemicznych; spada metabolizm mitochondrialny dla wszystkich substratów z wyjątkiem leucyny i lizyny. Podobnie więc jak w komórkach śródbłonka poddanych hiperglikemii upośledzony jest metabolizm pirogronianiu, ale nie towarzyszy temu wzrost metabolizmu kwasów tłuszczowych, tylko aminokwasów ketogennych katabolizowanych do acetyl-CoA. Nie ma też zmian ekspresji dehydrogenazy pirogronianowej (E3BP) wskazując na inny, niż w hiperglikemii, mechanizm upośledzenia metabolizmu pirogronianiu, przy porównywalnych wzrostach KH1 i LDH? Doktorantka wskazuje na rolę HIF1 $\alpha$ . Trudno jednak chyba jednoznacznie stwierdzić, czy wszystkie opisywane zmiany metabolizmu śródbłonka wywołane przez niedotlenienie są zależne od HIF1 $\alpha$  bo nie zastało to udowodnione poprzez zastosowanie np. wyciszenia HIF1 $\alpha$ .

W kontekście wyników tej części rozprawy doktorskiej, recenzent ciekaw byłby opinii na ile badana odpowiedź na niedotlenienie (1 % tlenu) jest odpowiedzią patologiczną w stosunku do warunków normoksji (20 % tlenu), ze względu na fakt, że warunki tzw. fizjoksji dla stosowanych komórek (ok 5 % tlenu, *J Cell Mol Med. 2011 Jun; 15(6): 1239–1253*) znajdują się pomiędzy tymi wartościami i raczej bliżej warunków określanych tutaj jako warunki hipoksji. Z kolei, uszkodzenie komórek śródbłonka np. w toku przeszczepu narządów, związane jest raczej z mechanizmami niedotlenienia i reperfuzji, a nie tylko niedotlenienia. Szkoda, że nie podjęto więc tego typu badań, mogły by one wyjaśnić mechanizmy uszkodzenia mitochondriów śródbłonka dokonujące się w takim kontekście klinicznym.

Ostatnia część wyników dotyczy roli kanałów mitoBK<sub>Ca</sub>, a całą część wyników rozprawy doktorskiej zamyka krótka, 3-4 stronicowa dyskusja podsumowująca uzyskane wyniki rozprawy doktorskiej. W szczególności przedstawione są ryciny, które dobrze podsumowują odpowiedź śródbłonna na hiperglikemię i niedotlenienie. Jest też rycina przedstawiająca modulatory mitoBK<sub>Ca</sub>. Drobna uwaga dotyczy ryciny 5.1. Wynika z niej, że w komórkach poddanych hiperglikemii spada utlenianie glutaminy, a miałem wrażenie, że rośnie w stosunku do pirogronianu? Na koniec tej części pracy, Autorka umieściła pięć wniosków (nazwane summary?), z których jednak nie wszystkie stwierdzenia są udokumentowane w rozprawie doktorskiej. Nie mam jasności jakie szlaki sygnałowe mogą być aktywowane przez mitoROS w hiperglikemii, a jakie w niedotlenieniu (stwierdzenie numer 3)? O ile Autorka udowodniła udział UCP2 w regulacji wytwarzania ROS w hiperglikemii poprzez jego wyciszenie, analogicznych doświadczeń nie przeprowadzono w niedotlenieniu, więc to stwierdzenie pozostaje w sferze spekulacji (stwierdzenie numer 4).

Rozprawę zamyka streszczenie w języku polskim oraz lista prac doktorantki, z podziałem na te, których wyniki ujęto w rozprawie doktorskiej, oraz na pozostałe prace doktorantki.

Podsumowując, przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr Agnieszki Koziół p.t. „Aerobic metabolism of human endothelial cells under physiological and pathophysiological conditions” stanowi solidnie wykonaną, doskonale opisaną i unikatową porcję badań dotyczących bioenergetyki śródbłonna naczyniowego. Uzyskane wyniki uzupełniają naszą wiedzę dotyczącą metabolizmu śródbłonna oraz adaptacji mitochondrialnych mechanizmów śródbłonna do warunków przewlekłej hiperglikemii i niedotlenienia. Pomimo uwag krytycznych, które przedstawiłem w recenzji, uważam, że rozprawa doktorska Pani mgr Agnieszki Koziół stanowi wartościowe i spójne dzieło i oceniam je bardzo wysoko.

Z przyjemnością pragnę więc stwierdzić, że rozprawa doktorska Pani mgr Agnieszki Koziół spełnia wszelkie wymogi stawiane rozprawom doktorskim i wnioskuję o dopuszczenie doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Prof. dr hab. Stefan Chłopicki