

Jacek Golański

Ocena rozprawy doktorskiej mgr Justyny Katarzyny Matczak

Ocena

rozprawy doktorskiej mgr Justyny Katarzyny Matczak

**pt. "Ocena działania podchlorynu i nadtlenoazotynu na wybrane elementy układu
hemostazy"**

1

Rozprawa wykonana w Katedrze Biochemii Ogólnej Instytutu Biochemii Wydziału Biologii i
Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego

pod kierunkiem:

dr hab. Pawła Nowaka, prof. nadzw. UŁ.

Wprowadzenie do oceny rozprawy

Doktorantka, mgr Justyna Katarzyna Matczak podjęła temat wpływu reaktywnych formy tlenu i azotu, wytwarzanych podczas stresu oksydacyjnego lub jako produkty uboczne tlenowego metabolizmu komórki na modyfikacje związków biologicznych. Głównym składnikiem komórki ulegającym oksydacji są białka. Zmiany oksydacyjne w białkach, spowodowane przez reaktywne formy tlenu i azotu obejmują: tworzenie wodoronadtlenków białek, hydroksylację reszt aminokwasów aromatycznych i alifatycznych, nitrowanie reszt aminokwasów aromatycznych, utlenianie grup -SH, utlenianie reszt metioniny, przekształcanie niektórych reszt aminokwasowych w pochodne karbonylowe, fragmentację łańcucha polipeptydowego czy też tworzenie wiązań krzyżowych (1, 2).

Nadmierne generowanie reaktywnych form tlenu (RFT), azotu (RFA) czy chloru, takich jak m.in. podchloryn (OCI-) czy nadtlenoazotyn (ONOO-) może być przyczyną rozwoju chorób cywilizacyjnych. Wysokie stężenie RFT przyczynia się do wystąpienia stresu oksydacyjnego, co prowadzi do zaburzenia fizjologii układu hemostazy i jest ściśle związane z występowaniem chorób układu sercowo-naczyniowego, takich jak miażdżyca i zakrzepica (3). Stres oksydacyjny leży także u podstaw patofizjologii chorób neurodegeneracyjnych, chorób nowotworowych (4, 5), cukrzycy typu 2 (6), a także starzenia się organizmu (7).

*Jacek Golański**Ocena rozprawy doktorskiej mgr Justyny Katarzyny Mateczak*

Na podstawie analizy wyników wielu badań wypracowano i opublikowano wspólne stanowisko, stwierdzono jednoznacznie, że oksydacyjne modyfikacje białek leżą u podstaw większości chorób cywilizacyjnych (2).

Jednym z elementów szkodliwego działania RFT są opisywane w piśmiennictwie modyfikacje białek układu krzepnięcia, a dotyczące w pierwszym rzędzie fibrynogenu (8-13), rzadziej opisywane są modyfikacje białek układu fibrynolitycznego (14).

2

Autorzy licznych publikacji zwracają szczególną uwagę na oksydacyjne modyfikacje białek układu krzepnięcia pociągające za sobą takie zmiany w ich strukturze (np. oporność włókna na proteolizę), które przyczyniają się do rozwoju ryzyka wystąpienia zakrzepicy (15-17).

Obecnie nie ma wskazań do farmakologicznego hamowania w/w modyfikacji, ale uwaga badaczy skupia się na interwencjach dietetycznych i należy oczekiwać, że będzie przybywało dowodów na celowość stosowania takich interwencji.

W większości aktualnych publikacji dominuje pogląd, że niezbędne jest precyzyjnie opisanie mechanizmów działania RFT i opracowanie skutecznych strategii ograniczania ich szkodliwego działania (4, 18-22).

W tym kontekście, zastosowanie antyoksydantów, które mogą odwrócić/zahamować toksyczne działanie RFT, jest ze wszech miar celowe i godne wnikliwych badań (23-25).

Biorąc za podstawę przytoczony przegląd piśmiennictwa, można z całą pewnością stwierdzić, że podjęcie przez Doktorantkę tematu oceny działania podchlorynu i nadtlenoazotynu na wybrane elementy układu hemostazy jest uzasadnione.

Ponadto cele pracy są zgodne z najnowszymi wynikami badań naukowych i wychodzą naprzeciw oczekiwaniom klinicystów (16-18).

Charakterystyka i ocena rozprawy

Schemat badania

Oceniana praca jest typową pracą doświadczalną. Schemat badania można opisać w jedenastu punktach:

3

1. Izolowanie fibrynowego i plazminogenu z osocza zakupionego w RCKK.
2. Poddanie badanych białek działaniu nadchlorynu lub nadtlenoazotynu.
3. Inkubowanie badanych białek z antyoksydantami.
4. Poddanie badanych białek działaniu nadchlorynu lub nadtlenoazotynu w obecności antyoksydantów.
5. Próby z nadchlorynem blokowano za pomocą L-metioniny.
6. Próbkę białek, po przeprowadzeniu inkubacji poddawano rozdzielom elektroforetycznym Dot blot oraz Western blot.
7. W próbach białek po wystawieniu na działanie badanych czynników wykonywana była polimeryzacja (fibrynowego) i liza osocza/ badanie aktywności amidololitycznej plazminy
8. W próbach białek po wystawieniu na działanie badanych czynników wykonano oznaczenie grup karbonylowych techniką Dot i Western blot
9. W próbach białek po wystawieniu na działanie badanych czynników wykonano oznaczenie grup karbonylowych metodą ELISA.
10. Detekcja 3-nitrotyrozyny techniką Dot i Western blot
11. Oznaczanie stężenia znitrowanego fibrynowego w osoczu metodą ELISA

Cele pracy

1. Ocena wpływu modyfikacji cząsteczek fibrynowego i plazminogenu, wywołanych przez reaktywne formy tlenu, azotu i chloru na właściwości biologiczne obu białek. Fibrynogen i plazminogen poddawano działaniu podchlorynu oraz nadtlenoazotynu.

Jacek Golański

Ocena rozprawy doktorskiej mgr Justyny Katarzyny Mateczak

2. Określenie struktury fibrynogenu i plazminogenu, poziom markerów stresu oksydacyjnego technikami: Dot blot, Western blot, testem ELISA oraz metodami spektrofluorymetrycznymi.
3. Ocena właściwości prozakrzepowych, fizyko-chemicznych i litycznych fibryny, a także aktywność amidolitycznych plazminy.
4. Próba opracowania warunków metody immunoenzymatycznej, służącej do oznaczenia stężenia znitrowanego fibrynogenu w osoczu krwi człowieka. Warunki metody zostały dostosowane do potencjalnego, komercyjnego zastosowania w diagnostyce laboratoryjnej.
5. Określenie działania antyoksydacyjnego wybranych związków polifenolowych oraz, ciesząc się w ostatnim czasie dużym zainteresowaniem, nitroksydów.

4

Główny tekst ocenianej pracy liczy 146 stron maszynopisu, z czego 11 zajmuje piśmiennictwo, obejmujące 184 pozycje. Praca zawiera 32 tabele, 72 ryciny. Układ pracy jest charakterystyczny dla prac eksperymentalnych, i obejmuje część teoretyczną, opis stosowanej metodyki badawczej, omówienie wyników oraz ich dyskusję. Praca zakończona jest podsumowującymi wnioskami oraz streszczeniem.

- W części wstępnej Autorka opisuje bardzo obszernie układ hemostazy oraz zaburzenia jego elementów pod wpływem reaktywnych form tlenu.
- Założenia i cele pracy są przedstawione obszernie, ale bez szczegółowego wypunktowania.
- Opis metod zastosowanych w pracy jest bardzo szczegółowy.
- W części doświadczalnej Doktorantka prezentuje przytłaczającą liczbę wyników.
- Dyskusja jest konkretna i odnosi się w przeważającej mierze do prezentowanych wcześniej wyników.
- Piśmiennictwo jest bardzo obszerne i w przeważającej części aktualne.

Szczególnie wartościową częścią pracy jest opis i wyniki zastosowania dwóch układów modelowych, które pozwoliły na testowanie ochronnych właściwości związków fenolowych pochodzenia roślinnego i nitroksydów. Według mojej opinii model z zastosowaniem fibrynogenu można uznać za obiecujący (8-12, 23, 24, 26). Pozwala on na obserwacje zmian strukturalnych, regionalnych modyfikacji i zmian czynnościowych.

Wyniki dotyczące antyoksydacyjnych właściwości nitroksydów, szczególnie TEMPO pozwalają na konstruowanie hipotez dotyczących ich praktycznego zastosowania w profilaktyce i wspomaganiu leczenia chorób cywilizacyjnych (27-29).

Ponadto wątek przygotowania testu, służącego do oznaczenia stężenia znitrowanego fibrynogenu w osoczu krwi człowieka wpisuje się w bieżące potrzeby diagnostyki laboratoryjnej (12, 30, 31).

Ogólnie, rozprawa doktorska mgr Justyny Katarzyny Matczak sprawia solidne wrażenie, zarówno jeśli chodzi o wytyczenie kierunku badań i celu pracy, jak i sposobów realizacji tych celów oraz podsumowania własnych wyników badań. Oceniając pozytywnie recenzowaną pracę według ogólnie przyjmowanych kryteriach recenzji prac doktorskich, poniżej zamieszczam wykaz moich wątpliwości oraz komentarzy do niektórych wątków rozprawy. Pragnę podkreślić, że należy je odczytać nie jako krytykę pracy, lecz raczej jako zachętę dla Doktoranta do przedstawienia własnych opinii oraz wyjaśnień w stosunku do poruszanych kwestii.

Uwagi, wątpliwości, pytania i komentarze

Część teoretyczna

1. Wstęp jest zbyt ogólny i dotyczy głównie opisu układu hemostazy.
2. Najważniejsza część, czyli opis stresu oksydacyjnego, nie wprowadza bezpośrednio do wyznaczonych zadań badawczych. Zbyt mało jest informacji o znaczeniu modyfikowanego fibrynogenu i plazminogenu w patofizjologii chorób zakrzepowych.

3. Opis patofizjologii zakrzepicy jest przedstawiony bez powiązania z modyfikacjami badanych białek (fibrynogen, plazminogen).

6

Cel i założenia pracy

4. Wskazane jest przedstawienie celu pracy w postaci hipotez badawczych lub pytań.

Metodyka

5. Przed szczegółowym opisem zastosowanych metod brakuje krótkiego opisu przeprowadzonego eksperymentu (plan eksperymentu).
6. Czy oznaczenia wykonywane były w powtórzeniach, jaki współczynnik zmienności CV przyjęto w pracy dla stosowanych metod?

Wyniki

7. W pracy Doktorantka zastosowała ogromną liczę wykresów i tabel. Nadmiar prezentowanych informacji jest nieco przytłaczający.
8. Niektóre z wykresów są nieczytelne.

Dyskusja

9. Opis znaczenia modyfikacji śródbłonna naczyniowego i płytek krwi jest nie potrzebny. Nie dotyczy wyników pracy.
10. Dyskusja dotycząca modyfikacji oksydacyjnej fibrynogenu i plazminogenu nie uwypukla różnic i podobieństw omawianych wyników z podobnymi badaniami przeprowadzonymi przez innych autorów. Trudno jest odróżnić które fragmenty tekstu dotyczą własnych wyników doktorantki, a które cytowanych publikacji.
11. W pracy nie znaleziono wyższych stężeń znitrowanego fibrynogenu we krwi pacjentów chorujących na stwardnienie rozsiane lub szpiczak mnogi. Doktorantka powołuje się na nieopublikowane badania, w których znaleziono zależność (występowanie choroby – podwyższone stężeni nitro-Fg). W dyskusji brak jest informacji jaka to była grupa. W części materiały i metody brakuje opisów grup

Jacek Golański

Ocena rozprawy doktorskiej mgr Justyny Katarzyny Matczak

pacjentów, a w części wyniki – brak wyników tej części pracy. Wskazana by była szersze przedyskutowanie uzyskanych wyników.

12. Stwierdzenie Doktorantki „...metoda ta może zapewnić szybkie, czułe, selektywne i niezawodne narzędzie biologiczne do wykrywania jednego z najważniejszych markerów stresu oksydacyjnego w rozwoju zaburzeń krzepnięcia krwi” jest zbyt daleko idące, gdyż brakuje, w recenzowanej pracy, wyników upoważniających do takiej konkluzji.
13. Dyskutowanie zmian stężenia 3-cholorotyrozyny we krwi pacjentów nie ma poparcia w wynikach własnych Doktorantki.
14. W kolejnych fragmentach dyskusji przywoływane są prace kliniczne przedstawiające znaczenie oksydacyjnych modyfikacji fibrynogenu i plazminogenu, bez odniesień do eksperymentów *in vitro* podobnych do układów eksperymentalnych zastosowanych przez Doktorantkę.
15. Opis polifenoli powinien się znaleźć w części teoretycznej, a nie w dyskusji.

7

Wnioski

16. Wnioski nie do końca odzwierciedlają założenia/cele pracy. Przede wszystkim brakuje informacji o praktycznym zastosowaniu testu do oznaczania znitrowanego fibrynogenu we krwi.

Piśmiennictwo

17. Doktorantka powołuje się na 222 publikacje, ale wskazane było by uzupełnienie piśmiennictwa o niektóre najnowsze pozycje.

Podsumowanie

Pracę opisującą szkodliwy wpływ reaktywnych form tlenu (RFT), azotu (RFA) czy chloru, takich jak m.in. podchloryn (OCI-) czy nadtlenoazotyn (ONOO-) na białka układu krzepnięcia i proponującą metody ich niwelowania należy uznać za wartościową i posiadającą znaczenie praktyczne. Należy podkreślić, że część wyników została już opublikowana (30).

Jacek Golański

Ocena rozprawy doktorskiej mgr Justyny Katarzyny Matczak

Doktorantka przedstawia wyniki, które wzbogacają naszą wiedzę o czynnikach ryzyka, chorób cywilizacyjnych. Najbardziej wartościowe wyniki dotyczą modeli eksperymentalnych umożliwiających badania właściwości różnych antyoksydantów.

Od strony praktycznej Doktorantka wykazała się dobrą znajomością wielu technik doświadczalnych, swobodą w zakresie posługiwania się nimi i trafnym formułowaniem wniosków z prowadzonych badań. Uwzględniając ciekawe rozwiązania pracy eksperymentalnej leżącej u źródeł ocenianej pracy, jak również jej wartości poznawcze oraz znajomość problematyki badań, uważam, że praca spełnia wymagania ustawy o tytule naukowym i stopniach naukowych z dnia 14 marca 2003 roku z uwzględnieniem późniejszych. W związku z powyższym, z prawdziwą przyjemnością, przedkładam Wysokiej Radzie Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego wniosek o dopuszczenie mgr Justyny Katarzyny Matczak do dalszych etapów przewodu doktorskiego oraz obrony pracy doktorskiej.

8

Łódź, dnia 21 listopada 2017 r.



dr hab. Jacek Golański

Zakład Zaburzeń Krzepnięcia Krwi

Katedra Nauk Biomedycznych

Uniwersytet Medyczny w Łodzi

ul. Mazowiecka 6/8

92-215 Łódź

Cytowane prace

1. Colombo G, Clerici M, Altomare A, et al. Thiol oxidation and di-tyrosine formation in human plasma proteins induced by inflammatory concentrations of hypochlorous acid. *J Proteomics* 2017; 152: 22-32.
2. Egea J, Fabregat I, Frapart YM, et al. European contribution to the study of ROS: A summary of the findings and prospects for the future from the COST action BM1203 (EU-ROS). *Redox Biol* 2017; 13: 94-162.
3. Kanaan GN, Harper ME. Cellular redox dysfunction in the development of cardiovascular diseases. *Biochim Biophys Acta* 2017; 1861(11 Pt A): 2822-9.
4. Mileo AM, Miccadei S. Polyphenols as Modulator of Oxidative Stress in Cancer Disease: New Therapeutic Strategies. *Oxid Med Cell Longev* 2016; 2016: 6475624.
5. Nosrati N, Bakovic M, Paliyath G. Molecular Mechanisms and Pathways as Targets for Cancer Prevention and Progression with Dietary Compounds. *Int J Mol Sci* 2017; 18(10).
6. Wilson AJ, Gill EK, Abudalo RA, et al. Reactive oxygen species signalling in the diabetic heart: emerging prospect for therapeutic targeting. *Heart* 2017.
7. Korovila I, Hugo M, Castro JP, et al. Proteostasis, oxidative stress and aging. *Redox Biol* 2017; 13: 550-67.
8. Colombo G, Clerici M, Giustarini D, et al. A central role for intermolecular dityrosine cross-linking of fibrinogen in high molecular weight advanced oxidation protein product (AOPP) formation. *Biochim Biophys Acta* 2015; 1850(1): 1-12.
9. Harutyunyan HA. Prothrombin and fibrinogen carbonylation: How that can affect the blood clotting. *Redox Rep* 2017; 22(4): 160-5.
10. Heffron SP, Parastatidis I, Cuchel M, et al. Inflammation induces fibrinogen nitration in experimental human endotoxemia. *Free Radic Biol Med* 2009; 47(8): 1140-6.
11. Luo Y, Shi J, Li J. Peroxynitrite induced fibrinogen site identification. *Biomed Mater Eng* 2015; 26 Suppl 1: S2241-8.
12. Martinez M, Cuker A, Mills A, et al. Nitrated fibrinogen is a biomarker of oxidative stress in venous thromboembolism. *Free Radic Biol Med* 2012; 53(2): 230-6.
13. Tadeusiewicz J, Nowak P. [The role of post-translational modification of fibrinogen in the pathogenesis of thrombosis]. *Polski merkuriusz lekarski : organ Polskiego Towarzystwa Lekarskiego* 2015; 38(224): 107-12.
14. Kolodziejczyk-Czepas J, Ponczek MB, Nowak P. Peroxynitrite and fibrinolytic system-The effects of peroxynitrite on t-PA-induced plasmin activity. *Int J Biol Macromol* 2015; 81: 212-9.
15. Forstermann U, Xia N, Li H. Roles of Vascular Oxidative Stress and Nitric Oxide in the Pathogenesis of Atherosclerosis. *Circ Res* 2017; 120(4): 713-35.
16. Steven S, Daiber A, Dopheide JF, et al. Peripheral artery disease, redox signaling, oxidative stress - Basic and clinical aspects. *Redox Biol* 2017; 12: 787-97.
17. Yang X, Li Y, Li Y, et al. Oxidative Stress-Mediated Atherosclerosis: Mechanisms and Therapies. *Front Physiol* 2017; 8: 600.
18. Shay J, Elbaz HA, Lee I, et al. Molecular Mechanisms and Therapeutic Effects of (-)-Epicatechin and Other Polyphenols in Cancer, Inflammation, Diabetes, and Neurodegeneration. *Oxid Med Cell Longev* 2015; 2015: 181260.
19. Mao XY, Jin MZ, Chen JF, et al. Live or let die: Neuroprotective and anti-cancer effects of nutraceutical antioxidants. *Pharmacology & therapeutics* 2017.

Jacek Golański

Ocena rozprawy doktorskiej mgr Justyny Katarzyny Matczak

20. Saha SK, Lee SB, Won J, et al. Correlation between Oxidative Stress, Nutrition, and Cancer Initiation. *Int J Mol Sci* 2017; 18(7).
21. Sfyri P, Matsakas A. Crossroads between peripheral atherosclerosis, western-type diet and skeletal muscle pathophysiology: emphasis on apolipoprotein E deficiency and peripheral arterial disease. *J Biomed Sci* 2017; 24(1): 42.
22. Thapa A, Carroll NJ. Dietary Modulation of Oxidative Stress in Alzheimer's Disease. *Int J Mol Sci* 2017; 18(7).
23. Bijak M, Nowak P, Borowiecka M, et al. Protective effects of (-)-epicatechin against nitrative modifications of fibrinogen. *Thromb Res* 2012; 130(3): e123-8.
24. Bijak M, Saluk J, Antosik A, et al. Aronia melanocarpa as a protector against nitration of fibrinogen. *Int J Biol Macromol* 2013; 55: 264-8.
25. Abdulkhaleq LA, Assi MA, Noor MHM, et al. Therapeutic uses of epicatechin in diabetes and cancer. *Vet World* 2017; 10(8): 869-72.
26. Hoffman M. Alterations of fibrinogen structure in human disease. *Cardiovascular & hematological agents in medicinal chemistry* 2008; 6(3): 206-11.
27. Oliveira C, Benfeito S, Fernandes C, et al. NO and HNO donors, nitrones, and nitroxides: Past, present, and future. *Medicinal research reviews* 2017.
28. Lewandowski M, Gwoździński K. Wykorzystanie nitroksydów jako leków oraz przeciwutleniaczy w stresie oksydacyjnym indukowanym przez chemioterapeutyki stosowane w terapii nowotworów. *Postępy Biologii Komórki* 2015; 42(4): 667–86.
29. Tabaczar S, Talar M, Gwozdziński K. [Nitroxides as antioxidants - possibilities of their application in chemoprevention and radioprotection]. *Postępy higieny i medycyny doświadczalnej (Online)* 2011; 65: 46-54.
30. Nowak W, Trelinski J, Chojnowski K, et al. Assessment of oxidative/nitrative modifications of plasma proteins, selected ROTEM parameters and kinetics of fibrinogen polymerization in patients with multiple myeloma at diagnosis. *Med Oncol* 2017; 34(1): 4.
31. Tang Z, Wu H, Du D, et al. Sensitive immunoassays of nitrated fibrinogen in human biofluids. *Talanta* 2010; 81(4-5): 1662-9.

10