

*dr hab. Izabela Sadowska-Bartosz, Prof. nadzw. UR
Zakład Biochemii Analitycznej
Uniwersytet Rzeszowski
ul. Żelwerowicza 4, Pokój 408
35-604 Rzeszów, Podkarpackie Polska*

Tel: +48 735411114 Email: isadowska@poczta.fm

Rzeszów, dnia 24 grudnia 2017 r.

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Justyny Matczak
pt. „Ocena działania podchlorynu i nadtlenu azotynu na wybrane elementy
hemostazy”**

Uwagi ogólne na temat problematyki podjętej w rozprawie

Jedną z głównych przyczyn niestabilności układów biologicznych są nieuchronnie zachodzące posttranslacyjne modyfikacje białek tj. chlorowanie, nitracja czy glikacja. Są one wynikiem przede wszystkim zespołu procesów określanych mianem „parametabolizmu” – ubocznych nieenzymatycznych reakcji substratów i produktów przejściowych metabolizmu, nieuniknionych ze względu na chemiczną reaktywność tych związków. Modyfikacje białek są wzmożone w wielu chorobach, np. retinopatii cukrzycowej, miażdżycy, czy zakrzepicy. Należy zaznaczyć, że dokładny mechanizm zakrzepicy nie jest w pełni poznany. Pomimo, że w ostatnich latach dokonał się znaczący postęp w badaniach z zakresu patofizjologii zakrzepicy, wciąż stanowi ona ostateczną bezpośrednią przyczynę wielu chorób i śmierci. Wydaje się oczywiste, że zahamowanie procesów hemostazy pierwotnej prowadzących do rozwoju zakrzepicy powinno zmniejszyć ryzyko wystąpienia tej choroby. Ważną przyczyną zakrzepicy jest zaburzenie procesu fibrynolizy, u podstaw którego leży niedobór elementów tego układu, zwiększona synteza inhibitora aktywatora plazminogenu 1, uszkodzenie śródbłonna naczyń krwionośnych czy zmiany struktury i funkcji włókniaka. Upośledzenie procesu fibrynolizy może być związane ze zmianą struktury włókniaka, co jest rezultatem licznych modyfikacji, jakim ulega fibrynogen (białko ostrej fazy). Jego synteza i stężenie w osoczu może wzrosnąć 2-3 krotnie w odpowiedzi na stan zapalny. Wyniki ostatnich badań wskazują, że podwyższony poziom znitrowanej formy fibrynogenu w osoczu pacjentów z chorobą niedokrwienną serca jest czynnikiem ryzyka wystąpienia zakrzepicy. Żyłna choroba zakrzepowo-zatorowa obejmuje dwie jednostki kliniczne: zator tętnicy płucnej i zakrzepicę żył głębokich. Ocena częstości występowania tych chorób jest trudna. Wpływa na to zarówno duża różnorodność stosowanych

metod diagnostycznych, jak i różny przebieg choroby (w tym także bezobjawowy). Żylna choroba zakrzepowo-zatorowa jest często stwierdzana sekcyjnie u pacjentów, którzy byli leczeni z przyczyn internistycznych i zmarli w szpitalu.

Jedną z przyczyn zachwiania równowagi pomiędzy procesami pro- i przeciwzakrzepowymi może być stres oksydacyjny, nitracyjny, czy indukowany reaktywnymi związkami chloru, towarzyszący m.in. zakrzepicy. W wielu pracach wykazano, że reaktywne formy tlenu i azotu modyfikują funkcję wszystkich elementów układu hemostazy, czyli zespołu mechanizmów obronnych organizmu, pozwalającego na utrzymanie płynności krwi krążącej i chroniącego przed utratą krwi w wyniku przerywania ciągłości naczyń krwionośnych, tj. płytek krwi, komórek śródbłonka naczyń krwionośnych, osoczowych białek układu krzepnięcia i fibrynolizy. Stąd też zasadność podjęcia się zagadnienia poszukiwania związków przeciwdziałających zaburzeniom hemostazy wśród antyoksydantów naturalnych lub syntetycznych przez zespół dr hab. Pawła Nowaka, prof. nadzw. UŁ, a kolejny ich etap został podsumowany w rozprawie doktorskiej Pani mgr Justyny Matczak.

Techniczna i edytorska ocena oraz uwagi do układu rozprawy

Ogółem, praca w formie typowego jednostronnego wydruku, obejmuje łącznie 146 stron. Tytuł rozprawy jest trochę ogólnikowy i nieprecyzyjnie określa zakres pracy. Moim zdaniem należałoby sprecyzować „*Ocena działania podchlorynu i nadtlenoazotynu na wybrane elementy hemostazy*”, jako „*Poszukiwanie skutecznych inhibitorów nitracji i chlorowania fibrynogenu i plazminogenu*”.

Dobrze napisana rozprawa doktorska mgr Justyny Matczak składa się z *Części teoretycznej* (cztery rozdziały) oraz *Części doświadczalnej* (dziewięć rozdziałów). *Część teoretyczną* rozpoczyna lapidarny *Wstęp*, który w zasadzie nie powinien być oddzielnym rozdziałem (zajmuje bowiem niecałą stronę pracy). Kolejne dwa rozdziały „*Fibrynogen i układ krzepnięcia*” oraz „*Układ fibrynolityczny*” wprowadzają Czytelnika w zagadnienia dotyczące tych dwóch, niezmiernie ważnych dla hemostazy układów. W *Części teoretycznej* zasadne wydawałoby się obszerniejsze rozważenie problemu chlorowania i nitrowania fibrynogenu, a także plazminogenu. Zagadnienie to poruszono pobieżnie i tylko w odniesieniu do fibrynogenu na stronach 28-30, chociaż celowe byłoby bynajmniej wspomnienie w tej części rozprawy o posttranslacyjnych zmianach plazminogenu. Na modyfikacje tego białka zwraca uwagę np.: Gugliucci (2008) [Gugliucci A. *Hypochlorous acid is a potent inactivator of human plasminogen at concentrations secreted by activated granulocytes*. Clin Chem Lab Med. 2008;46(10):1403-9], czy Hathuc et al. (2006) [Hathuc C, Hermo R, Schulze J, Gugliucci A. *Nitration of human plasminogen by RAW 264.7 macrophages reduces streptokinase-induced*

plasmin activity. Clin Chem Lab Med. 2006;44(2):213-9]. Brakuje też wzmianki o substancjach/lekkach chroniących te białka przed posttranslacyjnymi modyfikacjami. Wydaje się to potrzebne, ponieważ celem pracy jest ocena działania podchlorynu i nadtlendioazotynu na wybrane elementy hemostazy i poszukiwanie skutecznych antyoksydantów chroniących wybrane białka przed takimi zmianami.

Co więcej, w rozpoczynającym *Część doświadczalną* rozdziale pracy: „*Założenia i cele pracy*” nie uzasadniono wyboru zastosowanych antyoksydantów naturalnych (kwercytyna oraz (-)-epikatechina) czy syntetycznych (TEMPO, 4-hydrokso-TEMPO, 4-acetamido-TEMPO). W rozdziale 6 „*Materiał i metody*” nie znalazłam także informacji odnośnie wyboru stężenia oksydantów i antyoksydantów użytych do oznaczeń.

Użyty warsztat metodyczny przez Doktorantkę był, w moim przekonaniu, optymalny dla realizacji celu pracy, nowoczesny i odpowiadający współczesnym światowym standardom badań w tej dziedzinie. Stosowane w pracy metody biochemiczne, czy też z zakresu biologii molekularnej, opisane są należycie szczegółowo. Za bardzo dobry pomysł uznać należy zastosowanie skaningowej mikroskopii elektronowej w celu wizualizacji struktury włóknika. Należy podkreślić, że mgr Justyna Matczak wybrała proste i dobrze zwalidowane metody biochemiczne izolowania badanych białek tzn. izolowała fibrynogen metodą zimnej precypitacji alkoholowej osocza, natomiast plazminogen metodą chromatografii powinowactwa. Do oceny biologicznych właściwości fibrynogenu wykorzystała pomiar szybkości tworzenia włóknika za pomocą metody turbidymetrycznej. Doktorantka oceniała również zmiany absorbancji w trakcie tworzenia skrzepu fibryny i jego lizy. W celu uzyskania informacji odnośnie nitracji i chlorowania fibrynogenu mgr Justyna Matczak oznaczyła stężenie grup karbonylowych oraz 3-nitrotyrozyny zarówno metodą Dot i Western blot, jak i ELISA. W celu oceny modyfikacji fibrynogenu przez nadtlendioazotyn i podchloryn zastosowała proste, choć niespecyficzne, pomiary fluorescencji dityrozyny i tryptofanu. W przypadku plazminogenu Doktorantka zbadała aktywność amidolityczną plazminy po aktywacji plazminogenu streptokinazą.

Drobna uwaga pod adresem części rozprawy 6 „*Materiał i Metody*”: wygaszanie fluoresceiny przez nadtlendioazotyn czy podchloryn służy w tym wypadku dla potwierdzenia ochronnego działania wybranych antyoksydantów, dlatego też wydaje się zasadne, aby zamieścić je jako pierwszą z opisywanych metod.

Opis wyników jest jasny, przejrzysty i przedstawiony w atrakcyjnej formie graficznej. Niemniej jednak, warto byłoby zaznaczyć w tej części rozprawy cesurę pomiędzy oryginalnym *novum*, a doświadczeniami kontrolnymi sprawdzającymi wyniki wcześniej opublikowane w

macierzystej Katedrze. Do tych ostatnich należało sprawdzenie ochronnego wpływu (-)-epikatechiny na modyfikacje fibrynogenu (6 μM) indukowane nitracją tj. nadtlendioazotynem (1-100 μM). Dane o protekcyjnym działaniu tego flawanoidu przedstawiono wcześniej w publikacji: *Thromb Res.* 2012;130(3):e123-8. Protective effects of (-)-epicatechin against nitrative modifications of fibrinogen. Bijak M, Nowak P, Borowiecka M, Ponczek MB, Żbikowska HM, Wachowicz B. Wzmianka na ten temat pojawia się dopiero w *Dyskusji* (str. 127).

Wyniki zamieszczone w recenzowanej rozprawie są relacją ze żmudnych zmagień Doktorantki z oznaczeniami biochemicznymi, nie zawsze uwieńczonych powodzeniem - co jest, niestety, nieodłączną cechą autentycznej pracy badawczej. Tak było w przypadku oznaczania 3-chlorotyrozyny w fibrynogenie metodą Dot i Western Blot z wykorzystaniem I-rzędowych przeciwciał antychlorotyrozynowych. Nie potwierdzono obecności 3-chlorotyrozyny w fibrynogenie, pomimo, że dane literaturowe wskazują na obecność tego markera stresu oksydacyjnego w białkach osocza. Niemniej jednak nie znalazłam informacji, czy przygotowano pozytywną kontrolę. Co więcej, żaden z zastosowanych polifenoli w przeprowadzonym teście ELISA nie chronił fibrynogenu przed skutkami działania podchlorynu, co Doktorantka tłumaczy dużym błędem.

Mam kilka drobnych uwag dotyczących tej części pracy, głównie pod adresem edycji rozprawy:

- (i) Rozdziały elektroforetyczne i ich produkty (Western blots) nie są poddane analizie densytometrycznej. Nie jest to konieczne w przypadku prezentacji wyników w rozprawie doktorskiej, ale byłoby przeszkodą w ich opublikowaniu w renomowanym czasopiśmie.
- (ii) Poddanie działaniu oksydantów preparatów białek o różnych stężeniach i przy różnych stosunkach molowych oksydantów do białek wymaga wyjaśnienia. W szczególności, porównanie modyfikacji białek w oparciu o zmiany fluorescencji nie jest uzasadnione w przypadku preparatów o różnych stężeniach białka (jak np. Ryc. 23, 24 i 60); trudno powiedzieć, że modyfikacje były mniejsze w przypadku plazminogenu, jeśli jego stężenie w mierzonym preparacie było wielokrotnie niższe (0.1 mg/ml) niż w przypadku fibrynogenu (2 mg/ml).
- (iii) Tabele 13-16 dokumentują zaskakujący efekt: poddanie fibrynogenu działaniu oksydantów, zwłaszcza nadtlendioazotynu, w obecności kwercetyny, sprowadza *lag time* poniżej wartości kontrolnej, a szybkość maksymalną polimeryzacji fibrynogenu powyżej wartości kontrolnej. W tym kontekście brakuje kontrolnych badań wpływu kwercetyny na polimeryzację fibrynogenu w nieobecności oksydantów.

(iv) W doświadczeniach dotyczących ochrony fluoresceiny przed utratą fluorescencji (Ryc. 51) stężenia antyoksydantów zostały źle dobrane, nie pozwalając na wyznaczenie wartości IC₅₀.

(v) Ryc. 66 i 67 dokumentują zaskakujący efekt (-)-epikatechiny na fluorescencję tryptofanu poddanego działaniu podchlorynu i nadtlenoazotynu, polegający na podwyższeniu poziomu fluorescencji powyżej poziomu kontroli w miarę wzrostu stężenia (-)-epikatechiny. Najwidoczniej Doktorantka, planując to doświadczenie, nie wzięła pod uwagę faktu, że (-)-epikatechina także fluoryzuje. Jej fluorescencja cechuje się maksimum wzbudzenia przy długości fali 280 nm (tak jak tryptofanu) i maksimum emisji przy długości fali 320 nm, niezbyt odległej od 340 nm, długości fali, przy której prowadzono pomiary. Warto wspomnieć, że fluorescencja (-)-epikatechiny jest podstawą metody oznaczania jej zawartości [Ramirez-Sanchez et al., Journal of Food Composition and Analysis 23 (2010) 790-793].

Znakomicie napisana 18-stronicowa *Dyskusja* krytycznie analizuje uzyskane wyniki na tle danych z piśmiennictwa. Ta część pracy wystawia dobre świadectwo dojrzałości naukowej Doktorantki.

Za najważniejsze wyniki uzyskane w pracy uważam wykazanie, że (i) zarówno podchloryn jak i nadtlenoazotyn zmieniały strukturę trzeciorzędową fibrynogenu, prowadząc do tworzenia agregatów HMW, nie wpływając na obraz elektroforetyczny plazminogenu; (ii) powodowały tworzenie w obu kluczowych białkach hemostazy grup karbonylowych, 3-nitrotyrozyny, dityrozyny oraz utlenienie reszt tryptofanu; (iii) podchloryn niemalże całkowicie hamował proces polimeryzacji monomerów fibryny, natomiast nadtlenoazotyn wykazywał słabsze działanie; (iv) w konsekwencji powstawał włóknik o patologicznych, prozakrzepowych właściwościach, zbudowany z cienkich, ściśle upakowanych włókien. Co więcej, w badaniach potwierdzono, że fibrynogen jest bardziej podatny na modyfikacje niż plazminogen.

Stosowane polifenole chroniły zarówno fibrynogen, jak i plazminogen przed wpływem oksydantów. Silniejsze działanie ochronne (-)-epikatechiny obserwowano po indukcji stresu oksydacyjnego podchlorynem, natomiast kwercetyny po indukcji stresu nadtlenoazotynem. Nitroksydy zapobiegały modyfikacjom indukowanym przez nadtlenoazotyn, nie chroniąc badanych białek przed wpływem podchlorynu. Najsilniej spośród badanych nitroksydów w próbach z fibrynogenem działał 2,2,6,6-tetrametylopiperydyno-1-oksyl (TEMPO), natomiast w próbach z plazminogenem najsilniejsze działanie ochronne wykazywał 4-acetamido-TEMPO. Mam pytanie dlaczego Doktorantka spośród wielu polifenoli wybrała do swoich badań kwercytnę i (-)-epikatechinę? Dlaczego wyselekcjonowane nitroksydy z grupy TEMPO miałyby być bardziej skuteczne jako antyoksydanty w porównaniu z nitroksydami z grupy PROXYL tj. 3-karbamoilo-PROXYL i 3-karbamoilodehydro-PROXYL?

Chciałabym skierować do Doktorantki kilka drobnych uwag o charakterze redakcyjnym. Nie podano źródła, z którego pochodzi wartość molowego współczynnika absorpcji dla nadtlenoazotynu. W rozprawie wynosi $\epsilon = 1679 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. W wielu źródłach podano wartość - pH 12, $\epsilon = 1670 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [np. Csaba Szabó, Harry Ischiropoulos and Rafael Radi; "Peroxynitrite: biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics" Nature Reviews Drug Discovery; **6**, 662–680 (August 2007)]. Proponowałabym użycie terminu „drugorzędowe przeciwciała ...znakowane peroksydazą chrzanową”, zamiast „drugorzędowe przeciwciała...skompleksowane z peroksydazą chrzanową” (str. 39, 43, 50). Może warto wyjaśnić stwierdzenie ze strony 125: „Aktualnie uznaje się, że stosunek stężenia antyoksydant:wolne rodniki wynosi 1:100”.

Ogólnie jednak edycja pracy jest dobra i zasługuje na uznanie.

Uważam, że rozprawa spełnia warunki stawiane rozprawom doktorskim przez art. 14 i 15 Ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki z dnia 14 marca 2003 r. Z pełnym przekonaniem wnoszę więc do Wysokiej Rady Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie mgr Justyny Matczak do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Sądzę też, że pomimo wyszczególnionych powyżej krytycznych uwag rozprawa zasługuje na wyróżnienie. Uwagi te mają charakter edytorski i są łatwe do usunięcia albo wyjaśnienia. Nie zmieniają faktu, iż od strony wartości naukowej i rzetelności danych eksperymentalnych praca jest bardzo dobra.

Izabela Jadorska - Bartosz

Rzeszów, dnia 24 grudnia 2017

dr hab. Izabela Sadowska-Bartosz, prof. nadzw. UR