

Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr Mileny Magdaleny Kotewicz
pt. „Wpływ urolityn na strukturę i funkcję podocytów kłębuszka nerkowego
w warunkach cukrzycy”

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska opisuje badania dotyczące poszukiwania nowych skutecznych terapii chroniących nerki w podocytopatii cukrzycowej. Celem pracy jest określenie wpływu urolityn na strukturę i funkcje podocytów w warunkach imitujących cukrzycę *in vitro*. Głównym obiektem badań Pani Mileny Magdaleny Kotewicz są komórki podocytarne stanowiące najważniejszy element kłębuszkowej bariery filtracyjnej.

Nefropatia cukrzycowa jest jednym z najczęściej występujących i najpoważniejszych powikłań cukrzycy, prowadzącym aż u około 30-50% chorych do przewlekłej niewydolności nerek, co wiąże się z bardzo kosztowną dializoterapią, a nawet z koniecznością przeszczepu. Nasza wiedza o przyczynach i mechanizmach tej postaci nefropatii jest wciąż bardzo niewielka. Wyniki badań z ostatnich lat wskazują, że kluczową rolę w patomechanizmie glomerulopatii cukrzycowej odgrywa uszkodzenie struktury i zaburzenia funkcji komórek podocytarnych kłębuszka, które odpowiadają za mechaniczne wzmocnienie bariery filtracyjnej kłębuszków, syntezę i rozbudowę ich błony podstawnej oraz za końcową regulację filtracji kłębuszkowej. Wszystkie te procesy w cukrzycy są zaburzone, a strukturalne uszkodzenia podocytów i błony podstawnej są pierwszymi widocznymi przejawami rozwijającej się glomerulopatii. Szereg badań klinicznych i eksperymentalnych wskazują na istnienie ścisłego związku pomiędzy stopniem uszkodzenia podocytów a dynamiką klinicznego przebiegu choroby i laboratoryjną oceną funkcji nerek. Niestety, naszej dobrej już wiedzy o zmianach strukturalnych w kłębuszkach, jakie zachodzą w cukrzycy, nie towarzyszy rozumienie zaburzeń funkcji i metabolizmu komórek kłębuszka. Dotyczy to szczególnie komórek podocytarnych. Stąd też tematyka rozprawy doktorskiej jest bardzo ważna i otrzymane wyniki stanowią istotny wkład w zrozumienie mechanizmów dzięki którym badane

urolityny mogłyby zapobiegać lub spowolnić nieodwracalne zmiany jakie obserwujemy w komórkach kłębuszka w cukrzycy.

Prezentowane przez Doktorantkę wyniki zostały opublikowane w dwóch pracach naukowych:

- 1) Kotewicz M, Lewko B. Urolithins and their possible implications for diabetic kidney. *Eur J Transl Clin Med* 2022 (vol. 5), 1: 53-63.
- 2) Kotewicz M, Krauze-Baranowska M, Daca A, Płoska A, Godlewska S, Kalinowski L, Lewko B. Urolithins Modulate the Viability, Autophagy, Apoptosis, and Nephrin Turnover in Podocytes Exposed to High Glucose. *Cells*. 2022,

Zarówno z pozycji nazwiska Doktorantki jak i faktu bycia w jednej pracy autorką korespondującą wynika jasno jej wiodąca rola w obu pracach. Natomiast nie zostało to poparte odpowiednimi oświadczeniami, które jednoznacznie wskazują jaki był udział współautorów i Kandydatki w powstaniu tych publikacji. Brak tych oświadczeń w pracy wieloautorskiej utrudnia jednoznaczne oszacowanie udziału Doktorantki w realizowanych badaniach. Proszę o komentarz.

Praca doktorska powstała w oparciu o zbiór powiązanych tematycznie artykułów naukowych (publikacja przeglądowa i publikacja oryginalna) oraz części nieopublikowanych jeszcze wyników badań, które wg informacji zawartej w pracy doktorskiej są przedmiotem przygotowanej obecnie publikacji. Przedstawiony do oceny tekst został przygotowany bardzo starannie pod względem edycyjnym. Podzielony został na rozdziały: Wykaz prac Naukowych, Inne osiągnięcia naukowe, Wykaz używanych skrótów, Streszczenie w języku polskim i angielskim, Wprowadzenie, Hipoteza i cel badań, Materiały i zastosowane metody badawcze, Wyniki, Podsumowanie, Piśmiennictwo oraz kopie prac wchodzących w skład zbioru. Biorąc pod uwagę całość materiału przedstawionego do oceny, nie mam wątpliwości, że Pani Milena Magdalena Kotowicz wykazała się samodzielną umiejętnością planowania eksperymentów, ich wykonania w części eksperymentalnej, odpowiednią analizą otrzymanych wyników, a także przygotowaniem tekstu naukowego. Wskazuje na to przedstawiona w bardzo spójny i logiczny sposób część pracy dotycząca wprowadzenia merytorycznego do tematyki rozprawy, metod i opisująca otrzymane wyniki. Pracę czytałam z przyjemnością. Doktorantka syntetycznie opisuje wstęp teoretyczny, który w sposób spójny i logiczny

doprowadza do postawionej hipotezy. Udowodniana w ten sposób doskonałą znajomość podstaw teoretycznych tematyki, którą się zajmuje. Potwierdzeniem znajomości tematyki badań jest również dołączony do cyklu artykuł przeglądowy. Nie mam wątpliwości, że realizowana tematyka jest oryginalna a zbadanie wpływu urolityn na funkcje podocytów jest podejściem nowatorskim. Niezwykle ciekawa jest również selekcja urolityn wybranych do badań. W ostatnich latach co raz więcej jest doniesień o roli naszej mikroflory jelitowej w kontekście naszego zdrowia i zapobiegania chorobom cywilizacyjnym. Stąd też wybór związków powstających w wyniku metabolizmu elagotanin i kwasu elagowego poprzez bakterie dystalnej części jelit uważam za temat bardzo ważny i aktualny. W kontekście tej tematyki ważne również wydaje się wyjaśnienie, czy coś wiadomo odnośnie konkretnych szczepów bakteryjnych odpowiedzialnych za powstawanie urolityn w naszym organizmie oraz czy w cukrzycy mogą zmieniać się ilości powstających urolityn w zależności od składu naszego mikrobiomu.

Oceniając osiągnięcie merytoryczne Doktorantki należy podkreślić, że zastosowała właściwe podejście metodyczne do rozwiązania postawionego w pracy celu naukowego. Badania zostały przeprowadzone na unieśmiertelnionej linii SVI podocytów mysich w warunkach imitujących hiperglikemię *in vitro*. Zastosowała również szereg metod, które zostały dobrane w odpowiedni sposób i obejmowały między innymi: analizę białek western blot, analizę zawartości mRNA techniką PCR w czasie rzeczywistym, liczne techniki mikroskopowe, wysokosprawną chromatografię cieczową sprzężoną ze spektrometrią mas, itd. Chciałabym tutaj podkreślić różnorodność zastosowanych przez Doktorantkę metod co stanowi podstawę do dalszego rozwoju naukowego oraz wskazuje na możliwość prowadzenia nowych zaawansowanych projektów naukowych w przyszłości.

W pierwszej części badań eksperymentalnych Doktorantka syntetycznie i logicznie opisuje efekty wywierane przez urolityny na procesy odpowiedzialne za przeżywalność i podstawowe funkcje podocytów w warunkach odpowiadających hiperglikemii. Ta część badań została przedstawiona w pracy oryginalnej w recenzowanym czasopiśmie naukowym. W mojej ocenie jest to spójna logicznie całość. Przedstawione wyniki badań wniosły ważny wkład w zrozumienie protekcyjnego wpływu urolityn na funkcje komórek podocytarnych w cukrzycy. Doktorantka wykazała jednoznacznie, że urolityna A jest odpowiedzialna za korzystniejsze efekty biologiczne w podocytach w porównaniu do urolityny B. Udowodniła protekcyjne działanie urolityny A na przeżywalność komórek

podocytarnych poprzez hamowanie apoptozy i stymulowanie autofagii w cukrzycy. Ważną obserwacją było również wykazanie protekcyjnego działania urolityna A na ważne białko błony szczelinowej, którym jest nefryna. Praca ta inspiruje do wielu kolejnych pytań. Jednym z nich jest wyjaśnienie różnic w działaniu urolityny A i B. W przedstawionej pracy nie ma informacji czy urolityna B, która nie wykazała działania protekcyjnego na żywotność komórek w cukrzycy, wpływała na apoptozę, autofagię czy też ekspresję nefryny. Czy może coś na ten temat wiadomo?

W drugiej części pracy eksperymentalnej Doktorantka przedstawia część wyników jeszcze nieopublikowanych. Zaprezentowane wyniki dotyczą wyjaśnienia roli urolityny A w modulowaniu aktywności TGF β w podocytach. Doktorantka wykazała, że urolityna A chroni komórki podocytarne przed niekorzystnym działaniem TGF β , który jest jednym z głównych czynników odpowiedzialnym za zaburzenia prawidłowego funkcjonowania filtru kłębuszkowego w cukrzycy. Do najważniejszych obserwacji należy wykazanie protekcyjnego działania na ekspresję białek błony szczelinowej, zmniejszenie zdolności podocytów do migracji czy też hamowanie przemiany nabłonkowo-mezenchymalnej podocytów. Są to bardzo ważne obserwacje z racji kluczowej roli komórek podocytarnych w tworzeniu struktury kłębuszkowej bariery filtracyjnej. Ponadto Doktorantka wykazała, na poziomie molekularnym, w jaki sposób urolityna A wpływa protekcyjnie na efekty wywierane przez TGF β . Stwierdziła, że urolityna A oddziałuje na ekspresję receptorów tego białka oraz aktywność szlaku sygnalizacyjnego zależnego od SNAD. Na tej podstawie postawiła hipotezę, że urolityna A może stanowić ochronę komórek podocytarnych przed czynnikami niszczącymi je w trakcie rozwijającej się cukrzycy. Ta część wyników nie została jeszcze opublikowana więc prosiłabym o uzupełnienie kilku informacji. Na Rycinie 14. brakuje zdjęć z mikroskopu fluorescencyjnego dla samej nefryny. Na zbiorczych zdjęciach razem z β -aktyną i wybarwionym jądrem trudno jest ocenić rozłożenie komórkowe nefryny. Podobna prośba dotyczy podocyny, dla której Doktorantka przedstawia zebrane wyniki na Rycinie 15. Czy była może zastosowana inna metoda potwierdzająca wzrost ilości podocyny w komórkach eksponowanych na wysokie stężenie glukozy i TGF β ? Podobnie na Rycinie 17. prośba o przedstawienie przykładowych zdjęć integryny- β 3 na podstawie których były liczone intensywności fluorescencji. Analiza komórkowej dystrybucji analizowanych białek jest ważnym elementem prowadzonych eksperymentów więc istotną częścią prezentowanych figur powinny być przykładowe zdjęcia. Prosiłabym również o przedstawienie sekwencji primerów, wielkości uzyskanych

produktów wraz z przykładowymi żelami przy badaniu poziomu ekspresji fibronektyny i receptorów dla TGF β .

Podsumowując pracę Pani Mileny Magdaleny Kotewicz oceniam wysoko. Uważam, że wniosła ona oryginalny i ważny wkład w badaniach nad poszukiwaniem nowych substancji o działaniu protekcyjnym na kłębuszkową barierę filtracyjną w cukrzycy. W przedstawionej pracy wykazała, że potrafi rozwiązywać problemy naukowe poprzez odpowiednie zaplanowanie badań oraz właściwą ich interpretację. W związku z powyższym stwierdzam, że przedstawiona do recenzji praca spełnia wymogi ustawowe stawiane rozprawie doktorskiej i dlatego wnoszę do Rady Nauk Farmaceutycznych Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie Pani Mileny Magdaleny Kotewicz do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ponadto biorąc pod uwagę wysoką wartość naukową otrzymanych wyników, duży zakres wykonanych prac, bardzo dobre zaplanowanie doświadczeń a także publikacje otrzymanych wyników, wnoszę o stosowne wyróżnienie tej rozprawy doktorskiej.

Fińskowite Agnieszka