



UNIWERSYTET ROLNICZY
im. Hugona Kołłątaja w Krakowie

Wydział Hodowli i Biologii Zwierząt
Katedra Żywienia, Biotechnologii Zwierząt i Rybactwa

Prof. dr hab. Dorota A. Zięba-Przybylska

Tel. 12 429 72 24

Kom. 601 415 283

Fax: 12 429 75 47

e-mail: rzzieba@cyf-kr.edu.pl



OCENA

PRACY DOKTORSKIEJ MGR MAŁGORZATY DOMŻALSKIEJ

wykonanej w Zakładzie Lokalnych Regulacji Fizjologicznych, Instytutu Rozrodu Zwierząt
i Badań Żywności Polskiej Akademii Nauk w Olsztynie,
pod opieką naukową Pani prof. dr hab. n. wet. Janiny Skipor-Lahuta i promotora pomocniczego
Pani dr Aleksandry Szczepkowskiej
nt.:

WPŁYW OSTREGO STANU ZAPALNEGO NA AKTYWNOŚĆ β -GLUKURONIDAZY
ORAZ STĘŻENIE KWERCETyny I JEJ METABOLITÓW W SPŁOCIE NACZYNIÓWKOWYM,
KRWI I PŁYNIE MÓZGOWO-RDZENIOWYM

Recenzja została przygotowana na wniosek Rady Naukowej Instytutu Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności PAN w Olsztynie podjęty w dniu 23 marca 2021 roku, na podstawie art. 179 ust. 2 i 3 *Ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. – Przepisy wprowadzające – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce* (Dz. U. z 2018 r., poz. 1669) w zw. z art. 20 ust. 5 *Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki* (Dz. U. z 2003, Nr 65, poz. 595 z późn. zm.)

Uwagi ogólne

Przedstawiona do oceny praca to manuskrypt liczący 137 stron z wydzielonymi dziewięcioma częściami - rozdziałami. Pierwszą stanowi Wstęp, poprzedzony Wykazem skrótów, Streszczeniem w języku polskim i angielskim. Na 22-stronach Wstępu Autorka bardzo przejrzyście przedstawiła tematykę swojej pracy w tym charakterystykę flawonoidów ze szczególną uwagą zwróconą na kwercetynę, kolejno omówiła bariery mózgowia: barierę krew-mózg (k-m) i krew-płyn mózgowo-rdzeniowy, każdy podpunkt Wstępu zaopatrzony został w ryciny, które bardzo pomagają w dobrym zrozumieniu tematu, ze względu na ich czytelność i ilustratywność. Następnie, Doktorantka w Celu pracy zaprezentowała hipotezę badawczą i służące jej weryfikacji zadania badawcze. Rozdział III to Materiały i Metody w których znajdziemy podpunkt dotyczący zwierząt wykorzystanych w doświadczeniach, opis hodowli komórkowych, następnie dokładne przedstawienie przebiegu poszczególnych doświadczeń odpowiadających wyznaczonym wcześniej zadaniom badawczym, opis metod analitycznych i techniki immunocytochemicznej. Rozdział ten wieńczy analiza statystyczna. Czwarta część pracy to omówienie uzyskanych wyników z podziałem na wydzielone wcześniej 4 zadania badawcze. Pomiędzy stronami od 100 do 111 zawarta jest Dyskusja nad wynikami pracy, następnie Podsumowanie i Wnioski. Literatura to 209 pozycji, z których 73% pochodzi z XXI w., a podkreślam to dlatego, że wśród pozycji literaturowych znajdziemy prace z 2021 roku, ale także pozycje z 1885, 1900, 1906, 1909, czy 1941 r., co świadczy o bardzo dużej wnikliwości Doktorantki w opracowaniu tematu pracy. Ostatnią częścią pracy jest Wykaz Rycin (42) i Tabel (13). Badania do pracy

doktorskiej zrealizowano w ramach projektu Konsorcjum Naukowego KNOW „Zdrowe Zwierzę – Bezpieczna Żywność”.

Flawonoidy to jedna z najliczniejszych grup związków polifenolowych. Ze względu na molekularną budowę podzielono je na flawonole, flawony, flawanony, flawanonole, izoflawony, katechiny i antycyjanidyny. Flawonolem powszechnie występującym w pożywieniu jest kwercetyna (3,5,7,3',4' pentahydroksyflawon). Jej obecność potwierdzono w wielu produktach spożywczych pochodzenia roślinnego. W naszym organizmie podlega ona szybkiemu metabolizmowi i równie szybko jest usuwana, zatem jej biodostępność jest zależna od naszej diety. Dotychczas w przyrodzie zidentyfikowano ponad 140 jego form, natomiast najczęściej występuje jako O-glikozyd bądź wolny aglikon.

Aktywność biologiczna związków polifenolowych zależy w dużej mierze od stopnia ich przyswajalności w przewodzie pokarmowym. Z kolei szybkość i wydajność absorpcji jelitowej są zdeterminowane strukturą chemiczną danego związku. Aglikony mogą ulegać wchłanianiu na drodze dyfuzji biernej, natomiast glikozydy ulegają wcześniejszej hydrolizie enzymatycznej w jelicie. Istotny wpływ na biodostępność związków polifenolowych ma mikroflora jelitowa zdolna do metabolizowania polifenoli z udziałem wytwarzanych przez bakterie enzymów, takich jak β -glukozydaza, β -glukuronidaza i hydrogenazy. Flawonoidy wykazują zarówno w badaniach *in vitro*, jak i *in vivo*, działanie przeciwutleniające/antyoksydacyjne, przeciwnowotworowe, przeciwmiażdżycowe, anty-agregacyjne, spazmolityczne, moczopędne, detoksykujące, przeciwartymiczne, hipotensyjne, a przede wszystkim przeciwzapalne.

Objawy ostrego stanu zapalnego zostały po raz pierwszy opisane przez rzymskiego uczonego i encyklopedystę Aureliusza Celsusa (25 p.n.e. – 50 n.e.). W jedynym zachowanym do naszych czasów dziele „De Medicina” opisał on cztery kardynalne objawy ostrego zapalenia, zwane niekiedy tetradą Celsusa: ból, zwiększoną temperaturę, zaczerwienienie i obrzęk. Piąty objaw stanu zapalnego – utrata funkcji i uszkodzenie narządu został dodany nieco później, prawdopodobnie przez greckiego lekarza i filozofa Galena (129 – 200 n.e.). Stres to ogół zmian fizjologicznych o charakterze przystosowawczym, które służą obronie organizmu. Wiele lat temu rozpoznano, że stres immunologiczny działa hamująco na szereg procesów w organizmie, stąd wciąż trwają poszukiwania czynników łagodzących stres – protekcyjnych, działających na różnych poziomach organizmu. Kwercetyna może działać ochronnie na komórki ośrodkowego układu nerwowego zapobiegając szkodliwemu działaniu stresu oksydacyjnego i stanów zapalnych. Neuroprotekcyjne działanie kwercetyny zależy od jej stężenia w mózgu, które regulowane jest na poziomie bariery k-m i bariery-krew płyn mózgowo-rdzeniowy (płyn m-r), zlokalizowanej w nabłonku spłotu naczyńiówkowego (SN) komór mózgu, np. w płynie m-r owiec, którym dośwaczowo podano zawiesinę łusek cebuli, kwercetyna występuje głównie w postaci aglikonu i jej biologicznie aktywnej metylowanej pochodnej – izoramnetyny, natomiast glukuronid kwercetyny i glukuronid izoramnetyny stanowią około 12%, co wskazuje na przechodzenie tych związków przez bariery mózgowia, oraz na możliwość lokalnej dekonjugacji glukuronidów.

Recenzja szczegółowa

1. Hipoteza badawcza i Cel pracy: Hipotezą badawczą przedstawionej do recenzji pracy było rozpoznanie czy: ostry stan zapalny wywołany liposacharydem (LPS) stymuluje aktywność β -glukuronidazy w krwi, aktywuje makrofagi, jak również zwiększa ekspresję chemokin w SN, co może prowadzić do wzrostu napływu komórek układu odpornościowego i tym samym potencjalnie zwiększa możliwość lokalnej dekonjugacji glukuronidu kwercetyny w SN i w płynie m-r, a co w konsekwencji może prowadzić do wzrostu stężenia aglikonu kwercetyny w płynie m-r.

W celu weryfikacji powyższej hipotezy Autorka pracy wyznaczyła cztery szczegółowe zadania badawcze: 1. określenie wpływu ostrego stanu zapalnego na ekspresję genu kodującego glukuronidazę *GUSB* oraz aktywność β -glukuronidazy w SN (*in vivo*) i w komórkach nabłonka SN (*in vitro*); 2. określenie wpływu ostrego stanu zapalnego na aktywność β -glukuronidazy w krwi, płynie m-r i w pożywce z hodowli komórek nabłonka SN; 3. określenie wpływu ostrego stanu zapalnego na kumulację glukuronidu kwercetyny w SN i w komórkach nabłonka SN i 4. określenie wpływu ostrego stanu

zapalnego na stężenie kwercetyny i jej metabolitów w krwi i w płynie m-r, po dożylnym podaniu glukuronidu kwercetyny.

Weryfikacja hipotezy badawczej została zrealizowana poprzez:

- zbadanie wpływu ostrego stanu zapalnego wywołanego LPS (400 ng/kg m.c.) w grupie 12 maciorek vs. do 12 owiec z grupy kontrolnej, której podano sól fizjologiczną. Po kolekcji krwi, owce poddano eutanazji w 3, 8 i 14 h po podaniu LPS/NaCl, a następnie przeprowadzono analizę ekspresji wytypowanych genów i aktywności β -glukuronidazy w SN;
- określenie wpływu podania dożylnego 16 maciorkom z zaimplantowanymi kaniulami do III komory mózgu soli fizjologicznej, następnie po 3h glukuronidu kwercetyny w r-rze soli fizjologicznej. Kolekcje krwi prowadzono przez 11 i dodatkowo 30 min. po podaniu glukuronidu kwercetyny. Ponadto pozyskiwano płyn m-r przez 11 h przy pomocy pompy strzykawkowej (doświadczenie przeprowadzono 2-krotnie w odstępie 2 tygodni);
- podanie 10 maciorkom LPS, a po 3 h glukuronidu kwercetyny w r-rze soli fizjologicznej. Pobory prób krwi i płynu m-r przeprowadzono analogicznie jak w poprzednim doświadczeniu. W osoczu krwi i w płynie m-r określano stężenie kwercetyny i jej metabolitów metodą HPLC-MS/MS oraz aktywność β -glukuronidazy metodą kolorymetryczną;
- zbadanie kumulacji glukuronidu kwercetyny w SN pod wpływem ostrego stanu zapalnego w grupie 3 maciorek, którym podano dożylnie LPS, a po 3h glukuronid kwercetyny vs. grupy kontrolnej, w której owcom podano analogicznie r-r soli fizjologicznej i glukuronid. Kolekcje krwi prowadzono co godzinę przez okres 5 h. Pozyskany SN z mózgu zamrożono w ciekłym azocie i przechowywano w temp. -80°C do czasu przeprowadzenia dalszych analiz, oznaczenia stężenia kwercetyny i jej metabolitów metodą HPLC- MS/MS.
- wybór modelu *in vitro* (hodowla pierwotna nabłonka SN szczura, linia komórkowa PCP-R, linia HIBCPP – modele bariery krew-płyn m-r) pozwalającego na ocenę reakcji komórek na wywołanie ostrego stanu zapalnego w wyniku podania LPS poprzez analizę genów markerowych zapalenia (ekspresja genów chemokin: *Cxcl1*, *IL6*, *IL8*) w komórkach. Ze względu na brak odpowiedzi LPS komórek linii PCP-R wykluczono ją z dalszych doświadczeń. Żywotność komórek nabłonka SN szczura w obecności LPS oraz komórek linii HIBCPP w obecności LPS oraz glukuronidu kwercetyny określano na podstawie pomiaru aktywności enzymów dehydrogenazy mitochondrialnej (test MTT) i dehydrogenazy mleczanowej (test LDH). W wybranych modelach *in vitro* zbadano wpływ LPS na ekspresję genu *GUSP* i aktywność enzymu β -glukuronidazy w komórkach;
- określenie wpływu LPS na kumulację glukuronidu kwercetyny w komórkach hodowli linii HIBCPP;
- wybarwienie immunocytochemicznie membran z komórkami linii HIBCPP w celu wizualizacji białek ZO-1, w celu potwierdzenia wytworzenia połączeń zamykających między komórkami.

2. Nowatorskość tematyki badawczej. Badania dotyczące oddziaływania ostrego stanu zapalnego (wywołanego LPS) na ekspresję genu kodującego enzym β -glukuronidazy w splocie naczyniówkowym i płynie m-r owiec – w badaniach *in vivo* oraz w komórkach nabłonka spłotu w badaniach *in vitro*; aktywność β -glukuronidazy w osoczu, płynie m-r w badaniach *in vivo* – na modelu owcy i w komórkach hodowli pierwotnej nabłonka SN - *in vitro*, oraz kumulację glukuronidu kwercetyny w SN owiec i w komórkach nabłonka SN jak i stężenia kwercetyny i jej metabolitów w osoczu krwi i płynie m-r są badaniami nowatorskimi – w bazie PUBMED znalazłam tylko 2 publikacje omawiające obecność kwercetyny i glukuronidu kwercetyny w splocie naczyniówkowym ludzi, a 41 prac na temat kwercetyny w kontekście bariery krew-mózg. Poza tym podejście naukowe Doktorantki do tematyki badań – wykorzystanie modelu owcy z implantowaną kaniulą do III komory mózgowej oraz doświadczenia *in vitro* - hodowli pierwotnej komórek spłotu i hodowli linii komórkowych – uznanych modelach bariery krew-płyn m-r uważam za innowacyjne i warte szczególnego podkreślenia.

3. Poprawność wyboru i opisu metod badawczych. Z pełnym przekonaniem stwierdzam, że wykorzystanie przez Doktorantkę technik *in vivo* i *in vitro* w tym hodowli pierwotnych komórek SN

wzbudza moje prawdziwe uznanie, tak samo jak zastosowanie hodowli linii HIBCPP „odwrotnej” lub „do góry nogami” na insertach i pomiar TEET – przeźbłonowego oporu elektrycznego. Ponadto zastosowanie wielu metod analitycznych – testy MTT i LDH, pomiary stężenia kwercetyny i jej metabolitów metodą tandemowego spektrofotometru mas, analizy kolometryczne, czy analizy molekularne ekspresji genów i w końcu technikę immunocytochemiczną stanowią o doskonałej znajomości warsztatu naukowego Doktorantki, co potwierdza bardzo szczegółowy opis stosowanych metod w pracy. Poprawne są także testy do analiz statystycznych przy opracowaniu wyników.

4. Dyskusja jako odniesienie do danych literaturowych. Doktorantka w sposób umiejętny i ciekawy przeprowadziła dyskusję interpretując swoje wyniki i odnosząc je do danych literaturowych prac prowadzonych na różnych gatunkach zwierząt od gryzoni po ludzi, skupiając się przede wszystkim na aktywności enzymu β -glukuronidazy w kontekście funkcji układu immunologicznego. Badania *in vitro* wykazały, że glukuronid kwercetyny wiąże się z komórkami nabłonka SN, a raczej nie wnika do ich wnętrza, co uzyskano dzięki hodowli „upside-down” i wskazało na fakt, że glukuronid wiąże się od strony odzwierciedlającej stronę naczyń krwionośnych. Wykorzystanie w pracy aż 209 pozycji literatury datujących się na okres ponad 130 lat od 1885 do 2021 świadczy o bardzo dobrym opanowaniu tematyki problemu przez Doktorantkę.

5. Podsumowanie i wnioski. Podsumowanie jest zwięzłym wypunktowaniem najważniejszych wyników z założonych na początku pracy 4 szczegółowych zadań badawczych. Wieńczące pracę wnioski stanowią odpowiedź na postawioną hipotezę badawczą i zakres problematyczny zadań.

Przedstawiona do oceny praca doktorska Pani mgr Małgorzaty Domżańskiej stanowi oryginalne osiągnięcie naukowe. Starannie przemyślana, a następnie konsekwentnie zrealizowana koncepcja pracy, opartej na nowoczesnych analizach, badaniach na zwierzętach i na modelu *in vitro* – hodowli pierwotnej i liniach komórkowych, pozwoliła na obiektywną i krytyczną ocenę kwestii naukowych postawionych w czterech zadaniach badawczych. Praca świadczy o dużej biegłości Autorki w poruszanej przez Nią tematyce odnoszącej się do wpływu ostrego stanu zapalnego na obecne w komórkach splotu naczyniówkowego komór mózgu, w płynie m-r jak i w osoczu krwi badane związki flawonowe i ich metabolity. Umiejętność krytycznej dyskusji otrzymanych wyników świadczy o dojrzałości naukowej Autorki.

Na zakończenie chciałabym skierować do Doktorantki kilka pytań, będących nie krytyką a uzupełnieniem informacji, których nie znalazłam w pracy:

1. Proszę o uzupełnienie informacji, czy wszystkie 46 maciorek zostało poddanych eutanazji, szczególnie zależy mi na opisie losu owiec ($n=16$) z doświadczenia nr 2.
2. Jakie rasy reprezentowały maciorki – nie istnieje rasa mieszana, raczej krzyżówka ras, stąd moje pytanie.
3. W jakiej fazie cyklu reprodukcyjnego maciorek prowadzono doświadczenia, nie były poddane owarektomii, czy były ujednolicone pod względem fazy cyklu, czy prowadzono badania podczas spoczynku – anestrus?
4. Prowadząc badania również z wykorzystaniem kaniulowanych owiec i krów, mroziłam płyn m-r w -80°C , a zatem czy temperatura -40°C to przyjęta w literaturze temperatura wystarczająca do przechowywania w/w prób, czy wynika z Pani wcześniejszych doświadczeń?
5. Doświadczenie 5, w ilu dołkach hodowlanych prowadzono inkubację komórek linii HIBCPP w grupie kontrolnej i doświadczalnej.
6. Zapytam z ciekawości, ostatni raz izolację kolagenu z ogona szczura obserwowałam na ćwiczeniach podczas studiów, czy nie łatwiej było zakupić kolagen i pokryć nim płytki?
7. Używa Pani nazwy medium, czy nie lepiej po prostu pożywka hodowlana?
8. W Wykazie skrótów brakuje chyba dość ważnego „SN” – splot naczyniówkowy.

9. W wykazie firm sprzedających odczynniki, brakuje ich dokładnego opisu, czasem jest tylko nazwa firmy, a powinno być zamieszczone, nazwa firmy, miasto i kraj, z którego dany produkt pochodził, to tylko uwaga, która może pomóc w redagowaniu pracy do czasopism.

KONKLUZJA

Rozprawę doktorską nt. „**Wpływ ostrego stanu zapalnego na aktywność β -glukuronidazy oraz stężenie kwercetyny i jej metabolitów w splocie naczyniówkowym**” oceniam wysoko. Podjęty przez Doktorantkę temat jest istotny z naukowego i aplikacyjnego punktu widzenia. Pragnę podkreślić, iż wykorzystane techniki eksperymentalne i metody analiz laboratoryjnych umożliwiły uzyskanie nowatorskich wyników.

Z pełnym przekonaniem stwierdzam, że przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska nt. „Wpływ ostrego stanu zapalnego na aktywność β -glukuronidazy oraz stężenie kwercetyny i jej metabolitów w splocie naczyniówkowym” i indywidualny wkład Doktorantki spełniają wymogi określone w Ustawie z dnia 14 marca 2003 roku „O stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki” (dz. U. Nr 65, poz. 595, z późniejszymi zmianami) i zwraca się do Wysokiej Rady Naukowej Instytutu Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności Polskiej Akademii Nauk w Olsztynie, o przyjęcie rozprawy doktorskiej Pani mgr Małgorzaty Domżańskiej i dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Z poważaniem,



prof. dr hab. Dorota Zięba-Przybylska

Kraków, 4 maja 2021 roku