

Wydział Farmaceutyczny GUMed
Katedra i Zakład Patofizjologii Farmaceutycznej
dr hab. Barbara Lewko, prof. uczelni

Gdańsk, 13 listopada 2023

Recenzja rozprawy doktorskiej Pana mgr Tomasza Kuleszy

pt „Rola transporterów fosforanowych w rozwoju kłębuszkowej kalcyfikacji oraz w indukcji insulinooporności podocytów”

wykonanej pod kierunkiem dr hab.inż. Agnieszki Piwkowskiej, prof. Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Komórkowej PAN

Komórki podocytarne kłębuszków nerkowych stanowią jeden z trzech elementów bariery filtracyjnej, przez którą przesączane są w nerkach składniki krwi. Rola podocytów jest jednak bardziej złożona i obejmuje też syntezę prawie wszystkich białek tworzących filtr kłębuszkowy, ścisłą interakcję z pozostałymi komórkami kłębuszka i cewki bliższej nefronu, a także mechaniczne wsparcie włóscinek kłębuszka, w których ciśnienie krwi jest wyższe, niż w innych naczyniach włosowatych. Pomimo pełnienia tak wielu kluczowych zadań, są to jedyne komórki nerek, które nie mają zdolności proliferacji. Oznacza to, że utrata podocytów jest nieodwracalna, a to pociąga za sobą zniszczenie całych nefronów, prowadząc do postępującej niewydolności nerek. Wyjątkowo istotne jest więc poznanie mechanizmów uszkodzających te komórki, co może umożliwić ich ochronę w warunkach, kiedy narażone są na zniszczenie. Do takich czynników należy insulinooporność, która towarzyszy jednej z głównych chorób cywilizacyjnych, jaką jest cukrzyca typu 2. Niewydolność nerek jest jedną z głównych przyczyn zgonów w cukrzycy, a wywołana hiperglikemią i insulinoopornością podocytopatia jest początkiem postępujących i nieodwracalnych zmian w tym narządzie. Z tego względu temat badań będący przedmiotem dysertacji Pana mgr Tomasza Kuleszy uważam za szczególnie istotny i aktualny.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska składa się z tematycznie powiązanych trzech publikacji, z czego dwie są pracami oryginalnymi, a trzecia-pracą poglądową, podsumowującą aktualny stan wiedzy dotyczący sodozależnych transporterów z rodziny SLC20. W pracy tej podkreślono też, że tylko pojedyncze opublikowane artykuły odnoszą się do ekspresji tych białek w podocytach. Wszystkie trzy artykuły zostały opublikowane w czasopiśmie J Cell Physiol (IF 6,398), a Doktorant jest pierwszym autorem każdego z nich. Wskazuje to na Jego wiodącą rolę w powstaniu i opublikowaniu każdej z tych prac, a potwierdzeniem są stosowne oświadczenia wszystkich autorów, zamieszczone na końcu rozprawy. Publikacje poprzedzono syntetycznie sformułowanym, pięciostronicowym wstępem, po którym przedstawiono ogólny cel wraz z opisem celów szczegółowych, opis metod oraz omówienie wyników przedstawionych w każdej z publikacji. Kolejno zamieszczono pięć wniosków oraz wniosek końcowy, a także bibliografię obejmującą 66 pozycji literaturowych, w większości z ostatnich 10 lat.

Nieprawidłowa gospodarka fosforanowa i zwapnienie tkanek należą do powikłań często obserwowanych w cukrzycy. Mgr Tomasz Kulesza postawił sobie za zadanie określenie wpływu wysokiego stężenia glukozy, odpowiadającego hiperglikemii, a także wpływu wysokiego stężenia insuliny, odpowiadającego hiperinsulinemii na homeostazę fosforanową w podocytach. Celem Jego pracy było też określenie w podocytach ekspresji białek tworzących system transportu fosforanów. Eksperymenty przeprowadzone na szczurach z wyindukowaną cukrzycą wykazały, że zaburzeniom gospodarki fosforanowej towarzyszy kalcyfikacja tkanki nerek oraz zmiany ekspresji transporterów fosforanowych w kłębuszkach nerkowych. Kolejne, szczegółowe badania przeprowadzone na ludzkich podocytach ukazały, że komórki te posiadają zróżnicowany system transportu fosforanów, a zwyrodnienie tkanki nerkowej może wynikać ze spowodowanych cukrzycą zmian ekspresji tych białek. U podłoża rozwoju cukrzycy typu 2 leży insulinooporność i ściśle związana z tym hiperinsulinemia. Przeprowadzone przez Doktoranta badania na podocytach dowiodły, że przedłużona ekspozycja na insulinę o wysokim stężeniu znieczula komórki na działanie tego hormonu. Pan mgr Kulesza wykazał też, że mechanizm prowadzący do insulinooporności podocytów obejmuje translokację i interakcje pomiędzy białkami odpowiedzialnymi za transport fosforanów.

Przedstawione w dysertacji rezultaty są wynikiem wielu czasochłonnych badań in vivo i in vitro, z których każde z osobna wymaga opanowania specyficznego warsztatu badawczego. Dla opracowania wyników Doktorant posłużył się wieloma technikami analitycznymi, obejmującymi zarówno metody z zakresu biochemii, jak i biologii molekularnej, czy mikroskopii. Jest to dowodem, że w trakcie realizacji projektu, Pan mgr Kulesza opanował bardzo zróżnicowany warsztat badawczy, co na pewno korzystnie wpłynie na Jego dalszy potencjał naukowy. Ponadto, opublikowanie wyników badań w tak wysoko punktowanym i rygorystycznie recenzowanym czasopiśmie jest dowodem na umiejętność oceniania, analizowania i syntetycznego przedstawiania uzyskanych rezultatów. Dowodzi to również, że tematyka prac jest bardzo istotna z naukowego punktu widzenia.

Uzyskane w ramach tej pracy wyniki mają charakter innowacyjny i dostarczają nowych informacji, wzbogacających wiedzę o patomechanizmach uszkodzeń podocytów.

Najważniejsze obserwacje ujęte w rozprawie Pana mgr Tomasza Kuleszy dowodzą, że

- Podocyty ludzkie posiadają sodozależne transportery fosforanów, których ekspresja w hiperglikemii zmienia się, a to wiąże się z kalcyfikacją komórek oraz całych kłębuszków nerkowych
- Insulina obniża w podocytach błonową ekspresję białek uczestniczących w transporcie fosforanów.
- Insulinooporność w podocytach pojawia się nie tylko w odpowiedzi na wysokie stężenie tego hormonu, ale też, niezależnie od insuliny, wskutek zahamowania ekspresji transportera fosforanów

Tym nie mniej, w trakcie lektury dysertacji nasunęły mi się następujące pytania i uwagi:

1. Cel pracy- sformułowanie „wyjaśnienie wpływu środowiska cukrzycowego” jest poprawne w stosunku do eksperymentów in vivo na szczurach, ale nie do końca odpowiada warunkom hodowli podocytów in vitro. Pożywka hodowlana zawierała glukozę o wysokim stężeniu , ale w warunkach cukrzycy podocyty są dodatkowo ekspozowane na egzogenne czynniki , np. cytokiny czy hormony, pochodzące z innych komórek kłębuszka oraz z filtrowanego osocza.
2. W ramach pracy zostały osobno zbadane efekty uzyskane w warunkach hiperglikemii , a osobno w warunkach hiperinsulinemii. W cukrzycy T2 najczęściej oba te stany występują jednocześnie. Mam świadomość ograniczeń czasowych w realizacji projektu doktorskiego, ale brakuje mi jakiegokolwiek odniesienia się do potrzeby (planowania?) kolejnych badań, łączących hiperglikemię z hiperinsulinemią
3. W opracowaniu Doktorant ewidentnie myli dwa pojęcia: błony szczelinowej i szczeliny filtracyjnej. SD to błona szczelinowa (S-slit, D – diaphragm). Szczelina filtracyjna między podocytami to filtration slit. Odstępy pomiędzy wypustkami sąsiadujących komórek, to szczeliny, które są przesłonięte błoną (SD) rozpościerającą się nad szczeliną i łączącą te wypustki. Przydałby się schemat bariery filtracyjnej, na którym wyraźnie byłyby ukazane jej elementy.
4. Wstęp, str 12-„Podocyty, obok śródbłonna i błony podstawnej, są najbardziej dynamicznym elementem bariery filtracyjnej”. Bariera filtracyjna składa się z trzech wymienionych elementów, a podocyty są najbardziej dynamicznym elementem SPOŚRÓD tych trzech. Ale co konkretnie kryje się za ogólnym i mało mówiącym określeniem „dynamiczne” , które pojawia się w streszczeniu i we wstępie?
5. Ryc1 Brakuje wyjaśnienia skrótów określających konkretne białka. Schemat z pewnością miał na celu proste podsumowanie mechanizmów homeostazy fosforanowej, ale przez brak objaśnień prześledzenie schematu jest dość czasochłonne
6. SG- standardowe stężenie glukozy w pożywce RPMI1640 wynosi 11 mM i jest 2x wyższe, niż fizjologiczne stężenie glukozy w osoczu. Oznacza to, że podocyty kontrolne też są ekspozowane na glukozę o stężeniu i osmolarności jak w warunkach cukrzycy
7. Przeciwciała pierwszorzędowe są wymienione w Tabeli 1 w omówieniu wyników i Tab 2 w publikacji 1 . A przeciwciała drugorzędowe?. Dlaczego zostały pominięte?
8. W opisie procedur kilkakrotnie użyte jest słowo „permabilizacja”. Poprawnym określeniem jest permeabilizacja

Publikacja 1

1. kontrolne szczury miały glikemię .ok. 120 mg/dl, co dla gryzoni jest poziomem w zakresie normalnych wartości . Kontrolne ludzkie podocyty in vitro hodowano w pożywce zawierającej 198 mg/dl, co odpowiada nie normo-, a hiperglikemii
2. Rycina 3b przedstawia immunofluorescencyjnie barwione białka transporterów fosforanów, czemu towarzyszy komentarz, że intensywna fluorescencja występuje w błonie komórkowej i w wyrostkach stopowatych. Nie widzę jednak żadnego dowodu na wspomnianą tu komórkową lokalizację tych transporterów. Czy Doktorant dysponuje zdjęciami wskazującymi na kolokalizację jakiegoś białka błonowego z badanymi transporterami? Np. podocyny, nefryny (dla wypustek stopowatych) lub podokaliksyny (ciało komórki)?

Publikacja 2

1. Insulina w środowisku hodowlanym jest degradowana przez komórkowe insuliny. Czy po 24-godzinnej inkubacji podocytów z insuliną sprawdzono, jakie jest jej faktyczne stężenie?
2. Podocyty in vitro były inkubowane ze 100 nM insuliną, co jest opisane jako warunki hiperinsulinemii, natomiast kontrolne komórki pozostawały w pożywce bez insuliny. Można więc wnioskować, że kontrola dotyczyła komórek w warunkach hipoinsulinemii. Dlaczego nie inkubowano podocytów kontrolnych z insuliną o fizjologicznym stężeniu?

Publikacja 3

1. Fig 4 – dlaczego wybrano synaptopodynę, jako wskaźnik wspólnej lokalizacji z transporterami fosforanów? Transportery są umiejscowione w błonie, a synaptopodyna jest związana z aktyną wewnątrz komórek i jej ekspresja wskazuje na strukturę cytoszkieletu. Ciekawe byłoby pokazanie ekspresji transporterów Pit1 i Pit2 z synaptopodyną lub F-aktyną w warunkach hiperinsulinemii, kiedy cytoszkielet ulega reorganizacji, a jednocześnie zmienia się błonowa ekspresja transporterów

Wszystkie moje uwagi dotyczą spraw technicznych i nomenklaturowych i w żaden sposób nie wpływają na merytoryczną ocenę pracy doktorskiej.

Podsumowując, stwierdzam, że przedstawiona do oceny dysertacja doktorska mgr Tomasza Kuleszy jest niezwykle wartościowa zarówno z naukowego jak i aplikacyjnego punktu widzenia. Wnoszę tym samym do Komisji ds. Przewodów i Postępowań Doktorskich Rady Naukowej Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. Mirosława Mossakowskiego Polskiej Akademii Nauk o dopuszczenie mgr Tomasza Kuleszy do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Przedstawione w rozprawie doktorskiej wyniki mają nowatorski charakter i mogą bardzo istotnie przyczynić się do zrozumienia mechanizmów prowadzących do podocytopatii w cukrzycy. Ponadto, mogą one stanowić podstawę do opracowania farmakoterapii chroniącej podocyty przed skutkami insulinooporności. Dlatego, z racji na wysoką wartość merytoryczną rozprawy potwierdzoną wysokim sumarycznym wskaźnikiem IF = 19,194 (publikacje pierwszoautorskie), wnoszę o jej wyróżnienie.



Barbara Lewko