



Prof. dr hab. Krzysztof Zabłocki
Instytut Biologii Doświadczalnej
im. M. Nenckiego PAN

Warszawa, 24 listopada 2023r.

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr. Tomasza Kuleszy, zatytułowanej:
„Rola transporterów fosforanowych w rozwoju kłębuszkowej kalcyfikacji oraz indukcji
insulinooporności podocytów”.**

Promotor: dr hab. inż. Agnieszka Piwkowska

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska dotyczy zaburzeń w obrębie podocytów, co stanowi jeden z elementów w powstawaniu i rozwoju nefropatii cukrzycowej. W dobie nieustająco zwiększającej się zachorowalności na choroby cywilizacyjne w tym cukrzycę typu 2 nefrologiczne konsekwencje tej choroby (a także cukrzycy typu I), oraz konsekwencje insulinooporności związanej z dyslipidemią i otyłością są poważnym wyzwaniem dla diabetologów i nefrologów. Tym bardziej, że w początkowej fazie rozwoju nefropatia cukrzycowa przebiega w sposób skąpoobjawowy, a w chwili diagnozy może być trudna do leczenia. Skuteczne stawianie czoła wyzwaniom klinicznym wymaga dogłębnego poznania mechanizmów biochemicznych i molekularnych leżących u podstaw badanych patologii. Recenzowana praca wychodzi naprzeciw takim oczekiwaniom, a głównym celem badań opisanych w tej pracy nie jest rozwiązywanie problemów klinicznych ani szukanie możliwości terapeutycznych w nefropatii. Praca ta ma przede wszystkim charakter podstawowy i poznawczy, a potencjalne aspekty aplikacyjne nie są wysuwane na pierwszy plan. Opisane w pracy wyniki uzyskane pod kierunkiem dr hab. Agnieszki Piwkowskiej powstały w Zespole mającym za sobą wieloletnią, żeby nie powiedzieć wielopokoleniową tradycję badań nad fizjologią i biochemią nerek i mającym w swoim dorobku bardzo znaczące osiągnięcia w tej dziedzinie.

W swojej rozprawie Doktorant skupił się na mechanizmach biochemicznych leżących u podstaw patologicznej mineralizacji w obrębie kłębuszka nerkowego, zwłaszcza zachodzącej z udziałem podocytów w warunkach cukrzycy oraz na roli jednego z białek związanych z transportem fosforanu przez błony komórkowe oraz enzymu katalizującego uwalnianie pirofosforanu z cząsteczki ATP w regulacji insulinooporności podocytów. Ponadto przedstawił dowody na istnienie ścisłego związku między białkami zaangażowanymi w regulację mineralizacji a zjawiskiem insulinooporności podocytów.

Oceniana rozprawa jest przedstawiona w formie trzech publikacji, w tym dwóch doświadczalnych i jednej przeglądowej. We wszystkich pracach Doktorant jest pierwszym i jednocześnie korespondującym autorem. Ten fakt podkreśla Jego wiodącą rolę w prowadzonych badaniach. Pozostali współautorzy złożyli stosowne oświadczenia dotyczące ich udziału w każdej z tych publikacji. Doktorant również opisał swój wkład w powstanie tych prac. Nie mam wątpliwości

co do Jego kluczowej roli w każdej z nich ale wolałbym, żeby w tym przypadku było to opisane nieco dokładniej.

Oprócz załączenie kopii publikacji i wspomnianych oświadczeń rozprawa zawiera wszystkie wymagane części to znaczy: stronę tytułową, spis treści, listę publikacji wchodzących w skład rozprawy, informację o źródle finansowania badań, wykaz stosowanych skrótów, streszczenie w języku polskim i angielskim, informację na temat innowacyjności rozprawy, pięciostronicowy wstęp, cel pracy i uzasadnienie połączenia wskazanych publikacji w spójny merytorycznie zbiór, opis stosowanych metod, omówienie kolejno obu publikacji doświadczalnych, podsumowanie wyników, wnioski cząstkowe przedstawione w pięciu punktach, wniosek końcowy i bibliografia odnosząca się do tej części pracy (tzn. z wyłączeniem publikacji) zawierająca 66 pozycji.

We wstępie Doktorant krótko, ale w mojej opinii wystarczająco omówił wszystkie zagadnienia poruszone w załączonych publikacjach, tak by wprowadzić czytelnika w tematykę prowadzonych badań. Zwracam uwagę, że na stronie 14 napisane jest, że białko XPR1 uczestniczy w dokomórkowym transporcie P1 (czyli tak jak Pit1 i Pit2) natomiast na Ryc. 1 kierunek strzałki wskazuje coś przeciwnego. Może brakuje jakiegoś wyjaśnienia? A może to jest zwykły błąd edytorski?

Cele pracy zostały przedstawione klarownie. Podobnie uzasadnienie połączenia obu publikacji doświadczalnych w jeden zbiór jest wystarczające dla uznania spójności tych prac i spójności przedstawionej dalej historii.

Mam natomiast zastrzeżenie dotyczące części metodologicznej rozprawy. Jest ona napisana bardzo lapidarnie i w istocie jest tłumaczeniem tego, co znajduje się w publikacjach. W przeciwieństwie do bardzo skrótowych opisów spotykanych w opublikowanych pracach, w rozprawie doktorskiej opisy metod byłyby lepsze, gdyby były bardziej dokładne. Po pierwsze dokładny opis metody dodatkowo uwiarygodnia zaangażowanie wykonawcy, po drugie pozwala następcom powtórzyć doświadczenia dokładnie według tego samego protokołu i po trzecie pokazuje, że wykonawca dobrze wie na czym dana metoda polega. Informacja o stosowaniu się do zaleceń producenta akceptowalna w przypadku publikacji być może spełnia dwa pierwsze oczekiwania ale na pewno nie spełnia trzeciego.

Kolejnym punktem rozprawy jest omówienie i podsumowanie publikacji tworzących rozprawę. Wprowadzeniem do tej części jest praca przeglądowa wchodząca w skład rozprawy. Praca ta ukazała się wcześniej niż pierwsza praca doświadczalna i przez to stanowi wstęp ukazujący obszar zainteresowania doktoranta i wyznaczający kierunki dalszych badań.

Pierwsza praca doświadczalna udowadnia, że w warunkach cukrzycy, tutaj spowodowanej podaniem szczurom streptozotocyny (model do badań cukrzycy typu I) dochodzi do nefropatii potwierdzonej szeregiem testów analitycznych krwi i moczu oraz do zmniejszenia ekspresji oraz ilości białka kilku rodzajów transporterów fosforanu w kłębuszkach nerkowych. Podobnie w linii podocytów ludzkich utrzymywanych w hodowli o zwiększonym stężeniu glukozy (model hiperglikemii *in vitro*) dochodzi do specyficznego zmniejszenia ilości transkryptów oraz białek transporterów Pit1 i Pit2. Co więcej, w warunkach zwiększonego stężenia glukozy w pożywce zmniejsza się błonowa frakcja wszystkich badanych dokomórkowych transporterów fosforanu (głównie Pit1) podczas gdy zawartość białka XPR1 transportującego fosforan do środowiska zewnętrznego istotnie zwiększa się. Wszystkie te zmiany sprzyjają wzrostowi stężenia Pi w środowisku pozakomórkowym, co w oczywisty sposób sprzyja powstawaniu kryształów hydroksyapatytu. Ciekawe obserwacje dotyczą także zmian aktywności/dostępności dwóch enzymów bezpośrednio zaangażowanych w regulację stężenia fosforanu w komórkach i ich otoczeniu. Jednym z nich jest fosfataza uwalniająca pirofosforanu z pozakomórkowego ATP, a

drugim alkaliczna fosfataza hydrolizująca pirofosforan do dwóch reszt fosforanowych. W warunkach zwiększonego stężenia glukozy obserwowane jest obniżenie stężenia pirofosforanu, co jest efektem mniejszej wydajności pierwszego z tych enzymów (mniejsza transkrypcja genu i mniejszy udział białka we frakcji błonowej) oraz zwiększonej aktywności drugiego. Pirofosforan jest silnym inhibitorem wytwarzania hydroksyapatytu, a zatem obniżenie jego stężenia sprzyja mineralizacji. Dodatkowo hydroliza PPI dostarcza fosforanu nieorganicznego w przestrzeni pozakomórkowej. Przedstawione w tej pracy wyniki dotyczące zmian w aktywności i lokalizacji transporterów fosforanu w podocytach w warunkach zwiększonego stężenia glukozy w środowisku wskazują na nowy aspekt procesów mineralizacji prowadzących do nefropatii cukrzycowej.

Druga publikacja jest rozwinięciem badań opisanych powyżej i jej sednem jest wykazanie, że zmniejszanie się insulinooporności podocytów w hodowli komórkowej traktowanych insuliną przez 24 godziny jest skorelowane z powstawaniem kompleksów między transporterem fosforanu Pit1 oraz pirofosfatazą nukleotydową, czyli białkami regulującymi dostępność fosforanu oraz pirofosforanu w przestrzeni pozakomórkowej oraz między pirofosfatazą a receptorem insulinowym. Wykazano także, że prawidłowa odpowiedź podocytów na insulinę wymaga obecności białka Pit1. Ponadto brak tego białka powoduje niezależne od insuliny zmniejszenie się stężenia ATP, które jest donorem reszt pirofosforanowych. W sumie zaproponowano dość skomplikowany schemat wzajemnych uzależnień między wrażliwością podocytów na insulinę i możliwością wywołania sygnału insulinowego po pobudzeniu receptora a obecnością i komórkową lokalizacją wspomnianych białek uczestniczących w transporcie fosforanu i uwalnianiu pirofosforanu w hodowli podocytów. Co więcej, schemat ten można by dodatkowo skomplikować włączając do niego wyniki z poprzedniej publikacji a zwłaszcza obserwacje, że hiperglikemia, która do pewnego stopnia „naśladuje” stan insulinooporności i cukrzyca prowadzi do zwiększenia aktywności alkalicznej fosfatazy, a przez to obniżenia poziomu PPI, co sprzyja mineralizacji.

Uważam, że dla lepszego przedstawienia tych złożonych powiązań można by zaproponować schematyczny rysunek ułatwiający śledzenie omawianych zależności. Mógłby on znaleźć się na końcu wspólnego podsumowania wyników.

Podrozdział ten jest napisany krótko i treściwie. Z pewnością zawiera to co jest najistotniejsze w tej rozprawie. Zastanawiam się jednak, czy w tym miejscu nie można było zaproponować nieco szerszego spojrzenia na badane zagadnienia i przeprowadzić dyskusję na przykład dotyczącą innych procesów komórkowych indukowanych w warunkach cukrzycy i prowadzących do zaburzonej filtracji na skutek eliminacji podocytów (np. na drodze apoptozy lub upośledzonej autofagii), nawet jeżeli nie są to efekty bezpośrednio związane z mineralizacją i wrażliwością na insulinę. Takie rozszerzenie pokazałoby złożoność „nerkowych” skutków cukrzycy i hiperglikemii z kalcyfikacją jako jedną z wielu poważnych konsekwencji. Ten komentarz nie jest żadną istotną uwagą krytyczną a jedynie wyraża moje subiektywne wrażenie.

Do najważniejszych i nowatorskich wyników uzyskanych w pracy zaliczyłbym wykazanie obecności transporterów fosforanu w podocytach, chociaż z uwagi na fakt ich powszechnego występowania w różnych komórkach nie jest to obserwacja bardzo zaskakująca. Natomiast fakt, że wytwarzanie tych białek i ich lokalizacja w komórce zmienia się w warunkach podwyższonego stężenia glukozy w środowisku i jest skorelowana z mineralizacją kłębuszków nerkowych jest wynikiem nie tylko nowym ale też bardzo ciekawym. Niewątpliwie nowatorskim odkryciem jest wykazanie, że insulinooporność indukowana na skutek przedłużonego traktowania podocytów insuliną jest związana z tworzeniem się kompleksów między dwoma białkami, które jak wcześniej pokazano uczestniczą w kalcyfikacji kłębuszków nerkowych w warunkach hiperglikemii. To odkrycie pokazuje związek między cukrzycą i insulinoopornością a mineralizacją kłębuszków

nerkowych. Dodatkowo istnienie takiego związku podkreśla fakt, że prawidłowa odpowiedź podocytów na insulinę wymaga obecności transportera fosforanu Pit1.

Wszystkie trzy publikacje wchodzące w skład rozprawy ukazały się w renomowanym czasopiśmie o ustalonej opinii (*Journal of Cellular Physiology*, Wiley), co oznacza, że były poddane wnikliwej ocenie przez recenzentów. Dlatego nie widzę potrzeby ponownego oceniania ich przeze mnie. Natomiast pozwalam sobie na drobne sugestie, które nie mają znaczenia merytorycznego, ale wskazują na szczegóły które ułatwiają czytanie. Między innymi wydaje mi się, że nieco dokładniejszy opis zdjęcia z mikroskopii elektronowej (Ryciny w publikacji nr 1), w tym wskazanie strzałkami i nazwanie widocznych struktur nie byłby od rzeczy. Ponadto, w przypadku barwień immunocytochemicznych dobrze jest nieco dla zasady pokazać obraz komórek potraktowanych jedynie przeciwciałem drugorzędowym.

Podsumowując, recenzowana rozprawa dostarcza wielu nowych i ciekawych informacji, a jasno sformułowane cele cząstkowe osiągnięto przy pomocy dobrze opisanych metod doświadczalnych. Uzyskane wyniki są przekonujące i bardzo wartościowe. Z pewnością mają walor nowości i zdecydowanie wzbogacają wiedzę o mechanizmach biochemicznych związanych z funkcją podocytów w warunkach normy i patologii. Nieliczne uwagi i komentarze zamieszczone w recenzji nie wpływają na moją bardzo pozytywną ocenę pracy.

Dlatego uważam, że zgodnie z art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478, 619, 1630) przedstawiona mi do recenzji praca doktorska spełnia wszystkie oczekiwane wymagania. Zwracam się a zatem do Wysokiej Rady Naukowej Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. Prof. Mirosława Mossakowskiego PAN o dopuszczenie Pana Tomasza Kuleszy do dalszych etapów przewodu doktorskiego.