



Gdańsk, 08.04.2025 r.

Dr hab. Anna Wardowska
Katedra i Zakład Fizjopatologii
Wydział Lekarski
Gdański Uniwersytet Medyczny

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Honoraty Sikory
pt. „Aktywność proteolityczna enzymu ADAM 17 jako czynnika predykcyjnego
rozwoju nefropatii cukrzycowej”**

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr Honoraty Sikory pt. „Aktywność proteolityczna enzymu ADAM 17 jako czynnika predykcyjnego rozwoju nefropatii cukrzycowej” została zrealizowana w Katedrze Chemii Biomedycznej Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego, pod kierunkiem dr hab. Magdaleny Wysockiej, prof. UG oraz dr Natalii Gruba.

Praca doktorska Pani mgr Sikory została napisana w języku polskim i zawiera elementy typowe dla tego typu dysertacji, choć w rzadko spotykanym układzie. Dysertacja składa się z następujących części: Wprowadzenia teoretycznego (I), po którym następuje rozdział Metody (II); Cel pracy (III), Badania własne (IV), Wyniki i dyskusja (V), Podsumowanie i wnioski (VI). Dokument kończy wykaz dorobku naukowego doktorantki (VII), wykazy rycin (VIII) i tabel (IX) oraz bibliografia (X). Z kolei część właściwą pracy poprzedzają: spis treści, streszczenia (w języku polskim i angielskim), a także wykaz stosowanych skrótów.

Doktorantka w swojej rozprawie poruszyła istotne klinicznie zagadnienie nefropatii cukrzycowej wskazując na powiązanie aktywności enzymu proteolitycznego ADAM 17 z patomechanizmem tego powikłania cukrzycy. Oś przedstawionej pracy stanowi próba uzyskania substratów fluorogenicznych specyficznych dla enzymu ADAM 17, które mogłyby przyczynić się do identyfikacji sposobu monitorowania aktywności tej proteazy w moczu pacjentów. Doktorantka skupiła swoją uwagę na wyselekcjonowaniu sekwencji substratu enzymu ADAM 17 z wykorzystaniem metod chemii kombinatorycznej. Uzyskane przez doktorantkę substraty zostały następnie przebadane pod kątem ich selektywności wobec badanego enzymu. Dodatkowo, Doktorantka przeprowadziła analizy aktywności proteolitycznej enzymu ADAM 17 w wybranych układach biologicznych, w tym w medium z hodowli ludzkich podocytów oraz lizatów tych komórek. Wartością dodaną pracy są badania z wykorzystaniem szczurzego modelu cukrzycy oraz analizy moczu pacjentów z cukrzycą. Podjęty przez Doktorantkę temat jest niezwykle ważny w świetle problemów diagnostycznych dotyczących funkcji nerek u pacjentów z chorobami metabolicznymi, takimi jak cukrzyca, czy autoimmunologicznymi (np. toczeń rumieniowaty układowy). Istotny wydaje się również w szerszym kontekście, gdyż „nerki chorują po cichu”, co sprawia, że diagnostyka takich zmian z reguły rozpoczyna się u pacjentów ze



znaczącą utratą funkcji tego narządu. Dlatego też wszelkie działania diagnostyczne, umożliwiające wczesne wykrycie patologicznych zmian w nerkach mogą przyczynić się do znaczącej poprawy wykrywania i leczenia chorób nerek.

W rozbudowanym wprowadzeniu teoretycznym, Doktorantka scharakteryzowała enzym ADAM 17, należący do rodziny białek dezintegryny i metaloproteazy, opisując mechanizm jego działania oraz rolę w patogenezie szeregu chorób człowieka. Dość dużo miejsca poświęcono udziałowi enzymu ADAM 17 w rozwoju i progresji zmian nowotworowych, chorób sercowo-naczyniowych czy metabolicznych, z uwzględnieniem cukrzycy. Niestety, najslabiej przedstawiono znaczenie aktywności badanego enzymu ADAM 17 w patologii nefropatii cukrzycowej, będącej tematem niniejszej pracy. W części dotyczącej samego białka ADAM 17, Doktorantka przedstawiła również dostępną wiedzę dotyczącą naturalnych i syntetycznych inhibitorów badanego enzymu.

Następnie Doktorantka omówiła patomechanizmy cukrzycy i związanej z nią nefropatii cukrzycowej. Skrupulatnie opisana została klasyfikacja zmian zachodzących w nerkach na skutek przewlekłej hiperglikemii, metody diagnostyczne z podkreśleniem potencjalnej roli nowych biomarkerów utraty funkcji nerek, oraz metody terapeutyczne. Opisując patogenezę nefropatii cukrzycowej, Doktorantka wskazała na znaczenie enzymów proteolitycznych, ze szczególnym uwzględnieniem proteaz ADAM 10 i ADAM 17.

Kolejna część wstępu teoretycznego została poświęcona budowie nefronów i procesowi filtracji kłębuszkowej. Doktorantka opisała również rolę hiperglikemii w rozwoju glomerulopatii w przebiegu cukrzycy z uwzględnieniem modeli komórkowych. Ostatni podrozdział wstępu traktował o białku Klotho, jednym z celów aktywności proteolitycznej enzymu ADAM 17, którego obecność wiąże się z patologicznymi procesami zachodzącymi w nerkach. W tym miejscu warto podkreślić, iż informacje zawarte w części teoretycznej w sposób klarowny i wyczerpujący wprowadzają czytelnika w tematykę pracy. Uwagę zwraca dobrze opracowana część biologiczna, która mogła stanowić znaczące wyzwanie dla Doktorantki, z wykształcenia chemika.

W kolejnym etapie pracy Doktorantka przedstawiła rozdział „Metody”, który wg przyjętych zasad powinien opisywać metodykę stosowaną w pracy doktorskiej. Ku zaskoczeniu część ta stanowiła teoretyczną prezentację metod stosowanych w chemii kombinatorycznej. Natomiast właściwy opis metod zastosowanych w przedłożonej pracy doktorskiej znajdował się dopiero w rozdziale „Badania własne” oddzielonym od niniejszego celami pracy. Zastosowany przez Doktorantkę zabieg jest niestandardowy. Ulokowanie tej części w rozprawie doktorskiej powinno być lepiej przemyślane, by nie zakłócało ciągu myślowego związanego z przejściem z wprowadzenia teoretycznego do celów pracy. Niemniej nie ujemuje to znaczeniu tego fragmentu pracy, gdyż jego zawartość była przydatna w analizie dalszej części rozprawy doktorskiej.

Następnie Doktorantka sformułowała cel główny swojej pracy, którym było otrzymanie substratu fluorogenicznego selektywnego względem enzymu ADAM 17, z zastosowaniem metod



chemii kombinatorycznej opisanych w poprzedzającym rozdziale. Wyróżnione cele szczegółowe, m.in. tworzenie bibliotek substratów chromogenicznych i fluorescencyjnych, ocenę wpływu modyfikacji C-końca na szybkość hydrolizy substratu, wyznaczanie parametrów kinetycznych uzyskanych substratów czy ocena aktywności enzymu ADAM 17 w układach biologicznych, miały za zadanie umożliwić Doktorantce realizację podstawowego celu pracy.

Rozdział „Badania własne” to szczegółowy opis aktywności laboratoryjnej Doktorantki. Intuicyjnie rozdział ten można podzielić na dwa etapy pracy: część syntetyczną i część związaną z oceną właściwości uzyskanych związków. W pierwszej części tego rozdziału Doktorantka krok po kroku przeprowadziła czytelnika przez etapy powstawania poszczególnych substratów enzymu ADAM 17 z tworzonych przez siebie podbibliotek peptydowych, aż do momentu oczyszczania uzyskanych substratów. Druga część badań własnych skupiła się na wyznaczeniu parametrów kinetycznych substratów fluorogenicznych charakteryzujących się najwyższą specyficznością względem enzymu ADAM 17, mierzoną stopniem ich hydrolizy. Logiczną kontynuacją tych badań była ocena aktywności proteolitycznej enzymu ADAM 17 w układach biologicznych z zastosowaniem wybranych substratów. W tym celu Doktorantka wykorzystała badania na linii komórkowej ludzkich podocytów, moczu szczurów z indukowaną cukrzycą oraz ludzkim moczu uzyskanym od zdrowych ochotników i pacjentów z cukrzycą.

Rozdział wynikowy również poprowadzony został w nietypowy sposób, gdyż połączył wyniki z dyskusją. To rozwiązanie jest powszechnie stosowane w artykułach naukowych, lecz nie jest standardem w pracach doktorskich. Wybór tej formy uzasadniam specyfiką samej pracy, której głównym celem było uzyskanie konkretnego produktu – związku chemicznego. Ponadto możliwość dyskusji uzyskanych wyników z danymi literaturowymi wydaje się ograniczona, ze względu na małą ilość tych ostatnich. Niemniej Doktorantka w sposób logiczny przedstawia uzyskane przez siebie wyniki i próbuje je zestawić z dostępną literaturą. W tej części pojawiło się kilka wątpliwości, do których szczegółowo odniosę się w dalszej części recenzji.

Podsumowanie i wnioski zamykają część merytoryczną pracy. W syntetyczny sposób Doktorantka podsumowuje swoje osiągnięcia odnosząc się do poszczególnych celów swojej pracy, zarówno głównego jak i szczegółowych. Doktorantka z sukcesem otrzymała związki, z których wyselekcjonowała substrat wydajnie hydrolizowany przez enzym ADAM 17. W wyniku dalszej optymalizacji sekwencji wybranego związku w obszarze C-końcowym uzyskała substrat selektywnie hydrolizowany przez badany enzym, który następnie wykorzystwała do dalszych analiz. W badaniach biologicznych wykazała zależność aktywności enzymu ADAM 17 od warunków hodowli, wskazując na korelację hiperglikemii z aktywnością wewnątrz- i zewnątrzkomórkową badanego enzymu. Ponadto, powiązała obecność białka Klotho z proteolitycznym działaniem ADAM 17 i zasugerowała potrzebę dalszych analiz w celu określenia mechanizmu leżącego u podstaw tej zależności. Ważnym klinicznie wynikiem było potwierdzenie zwiększonej aktywności enzymu ADAM 17 w moczu zwierząt i ludzi z



hiperglikemią. Ostatni wniosek to forma sugestii dotyczącej potencjalnego zastosowania diagnostycznego otrzymanych związków.

W przygotowanym materiale znajdował się również opis dorobku naukowego Doktorantki, na który składają się artykuły naukowe, doniesienia konferencyjne oraz udział w projektach badawczych. W momencie oceny dysertacji, Doktorantka mogła wykazać współautorstwo czterech artykułów naukowych, przy czym w jednym z nich figuruje jako pierwszy autor. Mgr Sikora miała również okazję prezentować wyniki na konferencjach naukowych, dwukrotnie w formie referatu i czterokrotnie w formie plakatu. Warto podkreślić również zaangażowanie projektowe, gdyż Doktorantka może wykazać się dość dużą aktywnością w tym zakresie. Uczestniczyła w projekcie OPUS jako doktorant stypendysta. Wykazała się również umiejętnością pozyskiwania funduszy, gdyż kierowała trzema projektami badawczymi w ramach Badań Naukowych Służących Rozwojowi Młodych Naukowców oraz Uczestników Studiów Doktoranckich.

Pytania i uwagi:

1. W części teoretycznej Doktorantka dość szeroko opisuje aktywność badanego enzymu ADAM 17 w patogenezie szeregu chorób człowieka, ale w sposób minimalistyczny traktuje kluczowe dla niniejszej pracy zagadnienie, czyli znaczenie badanej proteazy w rozwoju nefropatii cukrzycowej. Z czego wynika brak omówienia danych literaturowych z tego zakresu?
2. Zastosowany przez Doktorantkę podział metodyki na część teoretyczną dotyczącą chemii kombinatorycznej i część opisującą badania własne jest niestandardowy. W moim mniemaniu obie części powinny stanowić całość. Proszę o wyjaśnienie przyczyn, dla których Doktorantka zdecydowała się na to rozwiązanie.
3. Opisane wyniki dekonwolucji podbibliotek wskazują na różnice w hydrolizie zależnej od reszty aminokwasowej w badanych pozycjach a danymi prezentowanymi w literaturze. Według danych uzyskanych przez Doktorantkę najwydajniej hydrolizie uległa podbiblioteka z resztą aminokwasową asparaginy w pozycji X4, natomiast wg danych literaturowych (tabela 15) to obecność reszty aminokwasowej leucyny w tej pozycji korelowała z najwydajniejszą hydrolizą. Doktorantka jedynie stwierdza wystąpienie takiej różnicy, nie podejmując żadnej dyskusji. Dlatego poprosiłabym o próbę wyjaśnienia z czego mogą wynikać tego rodzaju różnice (odnotowane dla praktycznie każdej analizowanej pozycji dołączanych reszt aminokwasowych).
4. Prosiłabym o opis chromatogramów HPLC, np. z ryciny 43, str. 136. Niestety dla osoby niezaznajomionej z metodą i interpretacją wyników, prezentowane dane są niezrozumiałe, a informacje umieszczone w tekście niewystarczające by odpowiednio przeanalizować prezentowane wyniki.
5. Doktorantka w swoich badaniach wskazuje trzy substraty: 1, 5 i 9, jako związki o najwyższym stopniu hydrolizy. Na rycinie 47, str. 143 zestawia wyniki hydrolizy dla wszystkich uzyskanych



substratów. Widać wyraźne różnice skali na poszczególnych wykresach, co pozwala wnioskować, że wybrany przez doktorantkę substrat 1 jest słabiej hydrolizowany przez ADAM 17 niż substrat 10 (rycina 47C). Czy mogłabym prosić o szczegółowe wyjaśnienie na podstawie jakich przesłanek Doktorantka dokonała swojego finalnego wyboru substratów do dalszych badań biologicznych? I dlaczego odrzucono na tym etapie substrat 10?

6. Na podstawie badań Doktorantka wybrała wyżej wymienione 3 substraty, jako te o najlepszych właściwościach i najwyższej specyficzności względem enzymu ADAM 17. Dlaczego zatem badania selektywności proteazy zostały wykonane jedynie dla substratu 5? Czy nie warto by było przeanalizować pod tym kątem pozostałe dwa substraty? Podobnie, do analizy hamowania aktywności badanej proteazy inhibitorem TAPI-0 wykorzystano jeden z substratów, pomijając w badaniu pozostałe dwa. Z jakich powodów Doktorantka podjęła taką decyzję? Uważam, że wszystkie przeprowadzone w tej pracy badania biologiczne powinny być wykonane z użyciem wszystkich trzech wyselekcjonowanych substratów. Czasem związki o najlepszych właściwościach fizykochemicznych nie wykazują najkorzystniejszych efektów biologicznych. Poproszę, by Doktorantka wyjaśniła dlaczego w badaniach biologicznych nie uwzględniła trzech substratów: 1, 5 i 9?
7. Proszę o wyjaśnienie użycia różnych substratów w badaniach na materiale ludzkim i szczurzym. Cemu w ocenie aktywności proteolitycznej enzymu ADAM 17 w moczu szczurów wykorzystano substrat 1, a w badaniach na ludzkim moczu zastosowano substrat 5? Podobnie wygląda sytuacja w analizie hamowania enzymu z użyciem inhibitora TAPI-0: w podstawowym teście na linii ludzkich podocytów użyty został substrat 1, a test hamowania w ludzkim moczu opierał się o wykorzystanie substratu 5.
8. W opisie metodyki badawczej zabrakło wyjaśnienia warunków hodowli zastosowanych w przypadku linii komórkowej ludzkich podocytów. Podobnie w wynikach ta informacja nie została we właściwy sposób zaprezentowana. Poproszę o wyjaśnienie jak poszczególne warunki hodowli miały się odnosić do stanów fizjologicznych i jaki był cel zastosowania ich w prezentowanym badaniu.
9. W badaniach na moczu pochodzącym od osób zdrowych i z cukrzycą, w próbce 640 (rycina 55, str. 156) widoczna była wysoka aktywność proteolityczna enzymu ADAM 17 bez inhibitora TAPI-0 i w jego obecności. Jak wytłumaczyć ten wynik? Czy zastosowanie innego substratu mogłoby wpłynąć na ten wynik?
10. W badaniach biologicznych zastosowano układy hodowlane, których zadaniem było określenie wpływu białka Klotho na aktywność enzymu ADAM 17. Doktorantka napisała: „Wyniki te wskazują, że zablokowanie ekspresji białka Klotho w komórkach podocytów prawdopodobnie prowadzi do zaburzenia w przekazywaniu sygnałów w szlakach sygnalizacyjnych, zależnych od enzymu ADAM 17.” Czy mogę prosić o próbę wyjaśnienia tego stwierdzenia? Prosiłabym, by Doktorantka dodatkowo odniosła się do wprowadzenia teoretycznego, w którym opisuje zależność między enzymami ADAM 10 i 17 a formami białka Klotho.



11. Co było pierwsze: jajko czy kura? W jaki sposób powinno się postrzegać rolę enzymu ADAM 17 w patogenezie nefropatii cukrzycowej? Czy enzym ten przyczynia się do wytworzenia zmian zapalnych czy raczej jest formą odpowiedzi na obecne zapalenie?
12. W pracy doktorskiej natknęłam się na kilka błędów edytorskich, które mogły wpłynąć na ogólny odbiór pracy. Dla przykładu, do opisu rycin nie zastosowano żadnego wyróżnienia (innej czcionki czy zmiany jej wielkości), co powodowało zlewanie się tych opisów z głównym tekstem pracy. Nie są one jednak na tyle istotne by poświęcać im więcej miejsca w niniejszej recenzji.

Podsumowanie:

Przedstawiona do recenzji praca doktorska mgr Sikory porusza niezwykle istotny klinicznie temat trudności w diagnostyce i monitorowaniu nefropatii, z podkreśleniem nefropatii cukrzycowej. Doktorantka w swojej pracy skupiła się na syntezie selektywnych substratów enzymu proteolitycznego ADAM 17, którego zmienioną aktywność wiąże się z dysfunkcją nerek. Idea diagnostyki nefropatii w oparciu o hydrolizę substratów omawianej proteazy w moczu pacjentów wydaje się dość nowatorska i warta dalszych badań. Mimo szeregu pytań i uwag przedstawionych w recenzji, chciałam podkreślić wysoką wartość naukową niniejszej rozprawy doktorskiej. Wyniki uzyskane przez Doktorantkę mogą przyczynić się do lepszego zrozumienia patomechanizmów zmian nerkowych związanych z przewlekłą hiperglikemią, oraz stanowić podwaliny dla nowoczesnych metod diagnostycznych.

Wniosek końcowy

Rozprawa doktorska Pani mgr Honoraty Sikory pt. „Aktywność proteolityczna enzymu ADAM17 jako czynnika predykcyjnego rozwoju nefropatii cukrzycowej” spełnia warunki określone w art. 187 ust. 1-3 Ustawy Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce z dnia 20 lipca 2018 z późniejszymi zmianami.

W związku z powyższym zwracam się do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauki Chemiczne Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie mgr Honoraty Sikory do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dyscyplinie nauki chemiczne.

dr hab. Anna Wardowska