



WARSZAWSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY

ZAKŁAD FIZJOLOGII I PATOFIZJOLOGII EKSPERYMENTALNEJ

Pawińskiego 3c, 02-106 Warszawa, tel. 22 57 20 734, e-mail: 1s7@wum.edu.pl

Warszawa, 25 lipca 2017

**Recenzja pracy doktorskiej mgr Patrycji Bronowickiej-Adamskiej
zatytułowanej “Badanie aktywności i ekspresja enzymów biorących
udział w tworzeniu siarkowodoru w różnych układach
doświadczalnych” (Study of the activity and expression of the enzymes
involved in the formation of hydrogen sulfide in various experimental
systems)**

Doktorantka za główne cele swojej pracy wybrała:

1. Zbadanie możliwości różnych tkanek prawidłowych oraz nowotworowych do tworzenia siarkowodoru, poprzez oznaczenie aktywności i ekspresji enzymów biorących udział w jego przemianach.
2. Zbadanie roli siarkowodoru w przebiegu procesu zapalnego związanego z uszkodzeniem śluzówki żołądka szczurów wywołanego stresem.

Do celów szczegółowych pracy należało opracowanie modyfikacji metody PR-HPLC, która umożliwi oznaczenie poziomu glutationu, cysteiny i cystyny oraz opracowanie metod umożliwiających oznaczenie stężenia siarkowodoru i aktywności enzymów biorących udział w wytwarzaniu siarkowodoru w tkankach o małej aktywności enzymów biorących udział w metabolizmie aminokwasów siarkowych i wytwarzaniu siarkowodoru.

W roku 1713 Bernardino Ramazzini, włoski lekarz uważany za ojca medycyny pracy, opisał w swojej pracy *De Morbis Artificum Diatriba* drażniące działanie siarkowodoru na oczy u osób oczyszczających kanalizację ściekową. Od tego czasu, przez blisko 300 lat siarkowodor w literaturze medycznej był opisywany jako toksyczny gaz.

W ostatnich dwudziestu latach pojawiły się wyniki licznych badań, które dowodzą, że siarkowodor podobnie jak tlenek azotu, jest ważnym mediatorem biologicznym, który bierze udział w regulacji funkcji wielu układów organizmu zwierząt. Co więcej, szereg badań wskazuje, że zaburzone wytwarzanie siarkowodoru towarzyszy wielu chorobom metabolicznym oraz nowotworowym.

Obecnie prowadzone są badania nad zastosowaniem donorów siarkowodoru w leczeniu chorób układu krążenia, chorób błony śluzowej żołądka i innych. Badania nad siarkowodorem napotykają jednak pewne problemy, takie jak trudności w oznaczeniu stężenia siarkowodoru w tkankach. Brak precyzyjnych metod pozwalających na określenie fizjologicznego stężenia siarkowodoru w tkankach, stwarza trudności w interpretacji badań z użyciem donorów siarkowodoru oraz inhibitorów jego wytwarzania.

W związku z powyższym, wybór tematu pracy oraz celów pracy zaproponowanych przez Panią mgr Patrycję Bronowicką-Adamską uważam za bardzo zasadny.

Przedłożona do recenzji praca doktorska liczy 71 stron maszynopisu, w skład którego wchodzi wprowadzenie, opis celu pracy, opis materiału i metod, przedruk czterech opublikowanych przez Doktorantkę prac oraz omówienie najważniejszych wyników i wniosków płynących z pracy. Do manuskryptu załączono oświadczenia współautorów, wskazujące indywidualny wkład Doktorantki w opublikowane prace. Cykl czterech prac oryginalnych, wchodzący w skład manuskryptu dotyczy tematyki z zakresu tworzenia siarkowodoru w różnych tkankach, w kilku układach

doświadczalnych oraz metod oznaczania siarkowodoru i aktywności enzymów biorących udział w jego wytwarzaniu. We wszystkich pracach Doktorantka jest pierwszym autorem. Prace to zostały opublikowane w prestiżowych pismach naukowych, o łącznym współczynniku oddziaływania IF blisko 11.

Starannie i przejrzysto napisane wprowadzenie oraz opis celów i metod wykorzystanych w pracy, stanowią doskonałe wprowadzenie do tematyki badań podjętych w przedłożonym cyklu prac.

W pierwszej pracy pt. “RP-HPLC method for quantitative determination of cystathionine, cysteine and glutathione: An application for the study of the metabolism of cysteine in human brain” opublikowanej w *Journal of Chromatography B* (2011), Doktorantka przy użyciu zmodyfikowanej przez siebie metody RP-HPLC, oznaczyła poziom cystationiny w mózgu ludzkim, wykazując wysokie zróżnicowanie poziomu cystationiny w zależności od badanego regionu mózgu. Dodatkowo w pracy oznaczono aktywność enzymów biorących udział w syntezie siarkowodoru.

W drugiej pracy z cyklu, pt. „An application of RP-HPLC for determination of the activity of cystathionine β -synthase and γ -cystathionase in tissue homogenates” opublikowanej w *Nitric Oxide* (2015), Doktorantka opracowała metodę badania aktywności układu enzymatycznego CBS/CTH w homogenatach tkankowych oraz zbadała aktywność powyższych enzymów w różnych tkankach mysich (mózgu, wątrobie, nerkach). W pracy wykazano, że tworzeniu siarkowodoru w wątrobie zależne jest głównie od aktywności CTA, natomiast w mózgu główną rolę wydaje się odgrywać CBS.

Kolejna, trzecia praca cyklu pt. „Hydrogen sulfide generation from l-cysteine in the human glioblastoma-astrocytoma U-87 MG and neuroblastoma SHSY5Y cell lines”, opublikowana w *Acta Biochimica Polonica* (2017) jest poświęcona badaniu wytwarzania siarkowodoru z L-cysteiny w komórkach z linii nowotworów układu nerwowego. W pracy tej wykazano istotne różnice pomiędzy badanymi liniami komórek nowotworowych w procesie wytwarzania siarkowodoru. Co ważne, w niniejszej pracy zastosowano opracowaną przez Doktorantkę modyfikację metody

oznaczenia siarkowodoru tworzonego w obecności L-cysteiny i wiążanego w warstwie agarozы.

W czwartej, ostatniej z cyklu pracy pt. "Hydrogen Sulphide Production in Healthy and Ulcerated Gastric Mucosa of Rats" opublikowanej w czasopiśmie *Molecules* (2017), Doktorantka przy zastosowaniu wymienionej powyżej metody oznaczania siarkowodoru, oraz przy zastosowaniu metod RT-PCR i Western-blot badała wytwarzanie siarkowodoru i ekspresję enzymów biorących udział w jego wytwarzaniu i degradacji. Badania prowadzone były na szczurzej, prawidłowej błonie śluzowej żołądka oraz na błonie śluzowej z owrzodzeniami. W badaniach tych nie zaobserwowano różnic w ekspresji czterech najważniejszych enzymów biorących udział w wytwarzaniu siarkowodoru.

W mojej ocenie cykl prac przedstawionych przez Panią mgr Patrycję Bronowicką-Adamską wnosi nową wiedzę w zakresie badań nad rolą siarkowodoru w układach biologicznych. Badania te dostarczają nowych informacji na temat stężenia siarkowodoru oraz aktywności enzymów biorących udział w metabolizmie siarkowodoru w różnych tkankach. W szczególności, na uwagę zasługują opracowane modyfikacje metod oznaczenia wytwarzania siarkowodoru i oznaczenia aktywności enzymów biorących udział w metabolizmie siarkowodoru.

Opis metodyki i wyników w cyklu opublikowanych prac jest precyzyjny i staranny, wskazujący na doskonałe opanowanie warsztatu badawczego i umiejętność analizy uzyskanych wyników. Wstęp i dyskusja w cyklu prac wskazują z kolei na bardzo dobre przygotowanie teoretyczne Doktorantki w zakresie tematyki dotyczącej fizjologicznej roli siarkowodoru, procesów biorących udział w jego wytwarzaniu oraz metod badawczych. Doktorantka wykazała także umiejętność krytycznej dyskusji wyników własnych w odniesieniu do informacji dostępnych w piśmiennictwie.

W ostatniej części manuskryptu pracy doktorskiej, Doktoranta w sposób bardzo czytelny przedstawiła najważniejsze wyniki i wnioski płynące z badań przedstawionych w cyklu powyżej opisanych prac oraz zamieściła streszczenie w języku polskim i angielskim.

Należy podkreślić, że manuskrypt jest napisany przystępnym i zrozumiałym językiem z zachowaniem dużej staranności pod względem edytorskim. W pracy jedynie sporadycznie pojawiają się drobne błędy edytorskie takie jak brak litery „e” w nazwie czasopisma „Molecules”, strona 22.

Podsumowując, w ocenie recenzenta Doktorantka wykazała bardzo dobre przygotowanie teoretyczne, opanowanie warsztatu badawczego i umiejętność analizy uzyskanych wyników. Praca wnosi nową wiedzę w zakresie badań nad siarkowodorem.

Rozprawa spełnia warunki określone w ustawie z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 z późn. zm.).

W związku z powyższym, wnioskuję do Wysokiej Rady Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Jagiellońskiego – Collegium Medicum o dopuszczenie Pani mgr Patrycji Bronowickiej-Adamskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie wnioskuję o wyróżnienie przedstawionej pracy doktorskiej, biorąc pod uwagę nowatorski charakter badań oraz sposób prezentacji wyników pod postacią czterech, pełnych i oryginalnych prac opublikowanych w prestiżowych czasopismach naukowych o zasięgu międzynarodowym.

dr hab. n. med. Marcin Ufnal

Kierownik Zakładu Fizjologii i
Patofizjologii Eksperymentalnej

dr hab. n. med. Marcin Ufnal