UNIWERSYTET MEDYCZNY W ŁODZI

Łódź, dnia 15 grudnia 2020 r.

dr hab. n. farm. prof. uczelni Bogusława Pietrzak
Zakład Farmakodynamiki, Katedra Biofarmacji
Wydział Farmaceutyczny
Uniwersytet Medyczny w Łodzi

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr farm. Michała Aleksiejczuka,

pt. „Wpływ aldosteronu na przepuszczalność naczyń krwionośnych w skórze szczura z cukrzycą"

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska została wykonana pod kierunkiem Pani prof. dr. hab. n. farm. Ewy Chabielskiej oraz dr n. farm. Anny Gromotowicz-Popławskiej, pełniącej rolę promotora pomocniczego, w Zakładzie Biofarmacji Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku.

Rozprawa doktorska Pana mgr farm. Michała Aleksiejczuka podejmuje bardzo ważną i aktualną tematykę patomechanizmu zmian, z którymi borykają się pacjenci z cukrzycą, zarówno 1 jak i 2 typu. U ponad 30% chorych dochodzi do szeregu, postępujących w czasie zmian związanych z zaburzeniami mikrokrążenia skóry, takich jak dermatopatia cukrzycowa, pęcherzyca cukrzycowa, obumieranie tłuszczowe skóry czy zespół stopy cukrzycowej. Zmianom tym towarzyszy lokalny stan zapalny, który może prowadzić do zwiększonej przepuszczalności naczyń krwionośnych i wtórnie nasilać ich przebieg. Wiadomo, że aldosteron poprzez aktywację receptora mineralokortykoidowego (MR) odgrywa znaczącą rolę w progresji zmian remodelingowych w sercu oraz śródbłonku naczyń krwionośnych, w przebiegu niewydolności mięśnia sercowego. W ostatnim czasie podkreśla się też rolę aldosteronu w wywoływaniu efektów lokalnych, m. in. w skórze, co nasuwa sugestię,

że aktywacja zlokalizowanych tam receptorów mineralokortykoidowych może leżeć u podstaw patologicznych zmian, w obrębie tych tkanek.

Dlatego też, podjęty przez Pana mgr Michała Aleksiejczuka temat badawczy mający na celu odpowiedź na pytanie czy rozwój dermatopatii związanych z cukrzycą, może zachodzić w mechanizmie zależnym od aldosteronu i jego receptora, jest w pełni zasadny i znakomicie wpisuje się w ważny kierunek poszukiwania nowych możliwości zmniejszenia ryzka ich rozwoju u chorych na cukrzycę, ma więc istotne znaczenie kliniczne.
Aby zweryfikować postawioną tezę, Doktorant sformułował dwa główne cele badawcze, które realizował dwuetapowo. W pierwszym etapie podjął próby ustalenia czy aldosteron i jego receptor biorą udział w regulacji przepuszczalności naczyń krwionośnych skóry zdrowego szczura, oraz określenia mechanizmu tego działania. Celem drugiego etapu badań była odpowiedź na pytanie; czy mechanizm rozwoju zmian obserwowanych w skórze szczura z cukrzycą typu-1, indukowaną streptazocyną, jest zależny od aldosteronu i receptora MR.

Dokonując oceny formalnej rozprawy należy stwierdzić, że licząca 144 strony dysertacja posiada układ typowy dla prac o charakterze doświadczalnym, na który składają się kolejno: Część teoretyczna/Wstęp; Cel pracy; Materiały i metodyka; Wyniki; Omówienie wyników i dyskusja; Wnioski; Streszczenie w języku polskim i angielskim; Bibliografia; Wykaz rycin i tabel. Właściwą część pracy poprzedza strona tytułowa, szczegółowy spis treści, indeks skrótów zestawiony w porządku alfabetycznym oraz przedstawienie dorobku naukowego Doktoranta. Całość pracy uzupełnia 41 rycin oraz 12 tabel.

Część teoretyczna pracy (Wstęp), licząca 38 stron, zawiera trzy podrozdziały: Układ renina-angiotensyna-aldosteron (RAAS); Mikrokrążenie skórne; Cukrzyca. W tej części dysertacji, Pan mgr Michał Aleksiejczuk, w oparciu o starannie przygotowany przegląd piśmiennictwa, przedstawił jak ewaluowało spojrzenie na RAAS od koncepcji klasycznego endokrynnego układu regulującego ciśnienie krwi oraz gospodarkę wodno-elektrolitową, do bardzo złożonej, obejmującej nowe równoważące się osie tego układu oraz niezależne, lokalne RAAS o charakterze parakrynnym, zaangażowane w fizjologię i patofizjologię wielu różnych narządów. Podkreślił jednocześnie, że całkowite rozgraniczenie działania układu endokrynnego i układów lokalnych nie jest możliwe, gdyż obszary ich działania mogą się wzajemnie nakładać. Dalej Doktorant zaprezentował aktualną wiedzę dotyczącą aldosteronu, jego znaczenia w fizjologii i patofizjologii narządów wynikające z jego genomowego i niegenomowego mechanizmu działania oraz receptorów, które może aktywować zarówno aldosteron (receptor MR) jak i kortyzol (receptor GR), pozostające we

wzajemnej zależności. Odnosząc się do wyników najnowszych badań Doktorant podkreślił, że efekt biologiczny aldosteronu może być też wywołany przez tzw. mechanizm wzajemnych oddziaływań, w którym na skutek pobudzenia receptorów MR lub GR dochodzi do współaktywacji innych, znajdujących się w pobliżu receptorów, tj. estrogenowego, AT1, beta-adrenergicznego, receptorów czynników wzrostu typu nabłonkowego, insulinopodobego czy płytkowego.
W kolejnym podrozdziale dysertacji jej Autor nawiązując do aktualnych źródeł piśmiennictwa, szeroko omawia mikrokrążenie skórne, strukturę i funkcję śródbłonka naczyniowego oraz konsekwencje jego dysfunkcji, takie jak: zmniejszona zdolność fibrnolityczna i wazodilatacyjna oraz biodostępność tlenku azotu, natomiast zwiększona przepuszczalność naczyń krwionośnych oraz produkcja prozapalnych czynników wzrostu i adhezyjnych. Jako markery dysfunkcji śródbłonka wymienia czynnik von Willebrand'a, rozpuszczalną formę białka 1 adhezji komórek naczyniowych, angiopoetynę-2 i adiponektynę. W dysfunkcyjnym śródbłonku obserwuje się również nasiloną apoptozę typu *anoikis*, w efekcie której dochodzi do dalszego pogłębiania się zmian. Wskazując na czynniki zwiększające przepuszczalność naczyń krwionośnych, akcentuje znaczenie czynnika wzrostu śródbłonka naczyniowego, czynnika aktywującego płytki krwi, von Willebrand'a, cytokin prozapalnych oraz innych czynników wzrostu. W dalszej kolejności Doktorant przedstawia rolę układu RAAs w mikrokrążeniu skórnym oraz wpływ aldosteronu na funkcję naczyń i śródbłonka w aspekcie mechanizmu rozwoju stanu zapalnego i działania prozakrzepowego.
W trzecim podrozdziale części teoretycznej dysertacji jej Autor omawia wpływ hiperglikemii na komórki skóry, śródbłonek i jego przepuszczalność oraz mechanizm prowadzący do rozwoju różnych powikłań skórnych. Starannie prezentuje przegląd literatury dotyczący zmian w funkcjonowaniu skórnego RAAS w przebiegu choroby oraz wpływu leków modulujących ten układ, na skórę cukrzycową.
Po lekturze rzetelnie opracowanej części teoretycznej rozprawy nasuwa się stwierdzenie, że Doktorant dobrze zna najnowsze piśmiennictwo, o czym świadczy odniesienie się do 316 prac innych badaczy. Znakomicie orientuje się w zakresie podjętych zagadnień, a szerokie ich omówienie, spełnia swoją rolę jako uzasadnienie celu i zakresu badań, stanowiąc jednocześnie dobre wprowadzenie w podjętą tematykę badawczą.

Kolejny rozdział; Metodykę badań Pan mgr Michał Aleksiejczuk przedstawił na 15 stronach dysertacji. Za cenne uzupełnienie tej części pracy uważam zamieszczone ryciny i schematy (7) oraz tabele (2), które ułatwiają zapoznanie się z przebiegiem szeroko zaplanowanych eksperymentów. W tej części znajduje się też informacja o pochodzeniu zwierząt wykorzystanych w procedurach badawczych, warunkach ich bytowania oraz miejscu wykonania badań; Zwierzętarnia Wydziału Farmaceutycznego

UM w Białymstoku. Na eksperymenty wykonywane na zwierzętach Doktorant uzyskał właściwe zgody Lokalnej Komisji Etycznej ds. doświadczeń na zwierzętach w Olsztynie. Natomiast nie znalazłam w pracy informacji dotyczącej liczby zwierząt wykorzystanych do realizacji badań. Niefortunne jest też sformułowanie, że wszystkie badania na zwierzętach przeprowadzono o stałej porze dnia, o godzinie 9 rano. Bardziej właściwe byłoby podanie przedziału czasowego niezbędnego do ich przeprowadzenia.
Doktorant w tej części dysertacji przedstawił schemat pierwszego etapu eksperymentu oceniającego wpływ ostrej dawki aldosteronu na przepuszczalność naczyń krwionośnych skóry szczura normoglikemicznego oraz roli receptora MR w mechanizmie działania aldosteronu, po którym nastąpił opis drugiego etapu oceniającego zmiany przepuszczalności naczyń krwionośnych skóry u szczurów z cukrzycą indukowaną streptazocyną oraz rolę aldosteronu i jego receptora w obserwowanych zmianach. Powyższe uzupełnił opis indukcji cukrzycy oraz podawania substancji i pobierania tkanek do dalszych procedur.
W eksperymencie ostrym zwierzęta otrzymywały dożołądkowo eplerenon (antagonistę MR) w jednorazowej dawce 100 mg/kg m.c lub indometacynę (antagonistę cyklooksygenazy) w dawce 8 mg/kg m.c.; a następnie po upływie odpowiednio 30 lub 60 min dokonano u tych zwierząt śródskórnych iniekcji aldosteronu lub jego rozpuszczalnika. Grupę kontrolną stanowiły zwierzęta, które otrzymywały tą samą drogą ekwiwalentną objętość rozpuszczalnika/nośnika podawanych środków. W eksperymencie przedłużonym szczurom podawano eplerenon przez 10 kolejnych dni w dawce 100mg/kg/dobę, podając ostatnią dawkę 24 godziny przed dokonaniem iniekcji śródskórnych i następujących po nich procedur badawczych, na które składały się: Pomiar przepuszczalności naczyń krwionośnych skóry; Ekstrakcja mRNA oraz analiza ekspresji metodą rt-qPCR; Pomiary stężenia aldosteronu w osoczu oraz w skórze metodą ELISA; Analiza histologiczna oraz immunochemiczna oraz dodatkowo badanie morfologii krwi i stężenia glukozy we krwi.

W celu zweryfikowania postawionych hipotez badawczych Doktorant ocenił zmiany przepuszczalności naczyń krwionośnych skóry metodą Milesa z późniejszymi modyfikacjami u zwierząt zdrowych, normoglikemicznych oraz z cukrzycą typu 1-go wywołaną streptozotocyną. Ponadto, metodami PCR i immunohistochemiczną oznaczył ekspresję MR, dehydrogenazy 11β-hydroksysteroidowej; zapewniającej selektywność MR względem aldosteronu, czynników prozapalnych, tj. czynnika von Willebranda i śródbłonkowego czynnika wzrostu naczyń oraz białka błon obwodowych; zapewniającego integralność naczyń. Istotną częścią projektu było przeprowadzenie badań histologicznych oraz immunochemicznych.

W mojej ocenie trudno zgodzić się z określeniem 10 dniowego podawania zwierzętom środków; badaniem chronicznym. W tekście rozprawy Autor używa też zamiennie nazw różnych dróg podania środków: podanie doustne lub dożołądkowe, natomiast w opisach rycin/schematów posługuje się w obu przypadkach skrótem *p.o.*

W podrozdziale Analiza statystyczna zaprezentowano testy, które wykorzystano w celu interpretacji uzyskanych wyników. Normalność rozkładu danych sprawdzono przy pomocy testu *Shapiro-Wilk'a*. Następnie porównanie pomiędzy grupami, w których uzyskano normalność rozkładu przeprowadzono przy wykorzystaniu 1-czynnikowej analizy wariancji ANOVA, z wielokrotnym porównaniem *post hoc* z użyciem poprawki *Bonfferoni'ego*. W przypadku braku rozkładu normalnego zastosowano test nieparametryczny Mann'a-Whitney'a.

Analogicznie do opisu metodyki badań Doktorant opisał uzyskane wyniki pierwszego i drugiego etapu projektu badawczego. W przeprowadzonych eksperymentach stwierdził, iż aldosteron, w mechanizmie zależnym od receptora MR, zwiększa przepuszczalność naczyń krwionośnych skóry szczura normoglikemicznego oraz nasila egzocytozę czynnika von Willebranda z komórek śródbłonka naczyń krwionośnych skóry. Zaobserwował, że przepuszczalność naczyń krwionośnych skóry może być bazalnie regulowana przez cyklooksygenazę, a efekt działania aldosteronu, polegający na zwiększaniu przepuszczalności naczyń krwionośnych, jest zależny od jej aktywności. Ponadto, wykazał iż u szczurów z indukowaną cukrzycą, również w mechanizmie zależnym od receptora MR, dochodzi do wzrostu przepuszczalności naczyń krwionośnych skóry, któremu towarzyszył wzrost stężenia aldosteronu w skórze i osoczu oraz spadek ekspresji dehydrogenazy 11β-hydroksysteroidowej w naczyniach krwionośnych skóry. Dodatkowo zaobserwował w naczyniach krwionośnych; egzocytozę czynnika von Willebranda oraz wzrost czynnika wzrostu śródbłonka naczyniowego, co może sugerować lokalny stan zapalny.
Natomiast eplerenon, selektywny antagonista receptora MR zmniejszał bazalną przepuszczalność naczyń krwionośnych skóry szczura z cukrzycą, nie zmieniając wartości tego parametru u szczurów normoglikemicznych. Dodatkowo, lek ten zmniejszał parametry stanu zapalnego poprzez redukcję ekspresji czynnika wzrostu śródbłonka naczyniowego w naczyniach skórnych oraz hamowanie egzocytozy czynnika von Willebranda z komórek śródbłonka.
Analiza histologiczna oraz morfometryczna skóry potwierdziła brak zmian oraz obrzęku, po podaniu aldosteronu zarówno u zwierząt otrzymujących obojętny rozpuszczalnik, jak i eplerenon.
Dodatkową wartość pracy stanowi fakt, iż Doktorant wykazał w niej po raz pierwszy ekspresję dehydrogenazy 11β-hydroksysteroidowej w naczyniach krwionośnych skóry szczura normoglikemicznego. Ponadto, po raz pierwszy u szczurów z cukrzycą

wykazano ekspresję na poziomie białka (bądź jej brak) MR, dehydrogenazy 11β-hydroksysteroidowej, czynnika von Willebranda, czynnika wzrostu śródbłonka naczyniowego oraz obwódki zamykającej, w poszczególnych strukturach skóry oraz udowodniono, że w przebiegu hiperglikemii ekspresja MR i dehydrogenazy 11β-hydroksysteroidowej w skórze jest mniejsza w porównaniu do zwierząt normoglikemicznych. Natomiast zmniejszona ekspresja dehydrogenazy 11β-hydroksysteroidowej może znosić selektywność receptora MR względem aldosteronu i predysponować go do wzmożonego pobudzenia także przez glikokortykosteroidy.

Istotną część ocenianej dysertacji stanowi bardzo dobre omówienie otrzymanych wyników. Autor rzeczowo podsumował szereg przeprowadzonych eksperymentów, dokonując ich krytycznej interpretacji. Podjął próbę logicznego wyjaśnienia obserwowanych zmian, wykazując się znajomością ich złożonych patomechanizmów.
Uzyskane przez Doktoranta wyniki badań poszerzają wiedzę na temat patogenezy tych chorób i wskazują na potencjalne zaangażowanie aldosteronu i receptora MR w mechanizm ich rozwoju. Udowodnił, że blokada tego receptora przez eplerenon poprawia funkcję skóry u szczurów z cukrzycą.
Powiązanie patogenezy zmian skórnych w cukrzycy z aldosteronem i jego receptorem wyznacza nowy kierunek możliwości terapeutycznych cukrzycy, uwzględniających korzyści jakie może wnieść zastosowanie antagonistów receptora MR, leków o ugruntowanej pozycji klinicznej. Istotną korzyść kliniczną może też wnieść dołączenie ich do miejscowej glikokotykoterapii dermatoz w przebiegu cukrzycy. Wyniki uzyskane przez Pana mgr Michała Aleksiejczuka mają zatem bardzo istotne znaczenie kliniczne i stanowią podstawę do wszczęcia obserwacji klinicznych w tym kierunku.
Wartość uzyskanych wyników recenzowanej pracy dodatkowo potwierdza fakt opublikowania ich części w pracy przyjętej do druku przez redakcję renomowanego czasopisma o wartości współczynnika oddziaływania *Impact Factor* = 2,644, w której Doktorant jest pierwszym autorem oraz zaprezentowania na 5 zjazdach i konferencjach naukowych o zasięgu krajowym bądź międzynarodowym.

Rozprawę podsumowują 4 właściwie sformułowane wnioski, wskazujące na wartość poznawczą oraz kliniczną uzyskanych wyników. Bibliografia obejmuje 316 pozycji literaturowych właściwie dobranych i umiejętnie cytowanych w dysertacji. W znakomitej większości (304 pozycji) są to anglojęzyczne prace naukowe, a około połowa z nich (151 pozycji) pochodzi z ostatnich dziesięciu lat.
Na wyróżnienie zasługują także układ ocenianej pracy, jej forma językowa i graficzna. Dysertacja napisana jest w sposób precyzyjny, ładną polszczyzną. Nieliczne błęby edytorskie, zwłaszcza w bibliografii (dla przykładu poz; 43, 133, 146, 199) nie wpływają na jej ocenę. Również pod względem graficznym praca cechuje się starannością i dużą dbałością o dopracowanie niezbędnych szczegółów.

Podsumowując, rozprawa doktorska Pana mgr Michała Aleksiejczuka stanowi podjęcie istotnego z punktu praktyki klinicznej problemu naukowego, kompetentnie i rzetelnie analizowanego w kolejnych etapach badawczych. Oceniana dysertacja świadczy o dobrym przygotowaniu Doktoranta do prowadzenia pracy naukowej. Udowadnia, że Pan mgr Michał Aleksiejczuk wykazuje umiejętność samodzielnego analizowania tekstów naukowych, planowania i przeprowadzania eksperymentów oraz krytycznej interpretacji otrzymanych wyników.

W świetle wyżej przedstawionej wysokiej oceny, na którą nie wpłynęły drobne uwagi, stwierdzam, że praca autorstwa Pana mgr Michała Aleksiejczuka pt. „Wpływ aldosteronu na przepuszczalność naczyń krwionośnych w skórze szczura z cukrzycą", spełnia wymagania formalne stawiane pracom doktorskim, zawarte w aktualnie obowiązujących regulacjach prawnych.

Tym samym wnoszę do Kolegium Nauk Farmaceutycznych Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku o dopuszczenie Pana mgr Michała Aleksiejczuka do dalszych etapów przewodu doktorskiego w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki farmaceutyczne.

Jednocześnie biorąc pod uwagę wysoki poziom naukowy i ważny aspekt kliniczny wyników uzyskanych w ocenianej pracy, wnioskuję o rozważenie możliwości wyróżnienia dysertacji.

Signed by / Podpisano przez:

Bogusława Pietrzak
Uniwersytet Medyczny w Łodzi

Date / Data: 2020-12-18 23:52