

## RECENZJA

### **PRACY DOKTORSKIEJ MGR FARM. PATRYCJUSZA KOŁODZIEJCZYKA „EKSPRESJA RECEPTORÓW MINERALOKORTYKOSTEROIDOWYCH W UKŁADZIE SERCOWO-NACZYNIOWYM SZCZURÓW Z CUKRZYCĄ”**

Niewydolność serca to jedna z podstawowych patologii w medycynie, która znacznie ogranicza sprawność chorych i wyraźnie skraca ich życie. Liczba zachorowań wzrasta, mimo postępu w dziedzinie farmakologii i medycyny interwencyjnej. Pociąga to za sobą ogromne nakłady finansowe na leczenie. Jej przyczyny są różnorodne, a patogenezą niezwykle złożoną i ciągle niecałkowicie poznana. Wśród wielu przyczyn leżących u podłoża niewydolności serca, ważne miejsce przypada zaburzeniom układu enzymatycznemu renina–angiotensyna–aldosteron (RAA), który w organizmie odpowiada między innymi za kontrolę objętości krążących płynów, regulację gospodarki jonowej, a przez to — również za wartości ciśnienia tętniczego. Mechanizm działania aldosteronu w układzie sercowo-naczyniowym jest złożony i może zachodzić zarówno przy udziale szlaków genomowych, jak i niegenomowych. Niezależnie od aktywowanych szlaków uznaje się, że główną rolę w mechanizmie działania aldosteronu odgrywają receptory mineralokortykosteroidowe (MR), a wiedza na temat ich rozmieszczenia i roli w układzie sercowo-naczyniowym jest nadal niepełna.

Analizując taki jeden aspekt szerszego zjawiska, warto zawsze pamiętać, iż może on leżeć u podstaw patogenezы schorzenia (a więc mieć charakter pierwotny), lub może być po prostu jego wynikiem (przyjmując w stosunku do niego charakter wtórny). Zróznicowanie tych zależności ma niebagatelne znaczenie tak w odniesieniu do samej patogenezы niewydolności serca i nadciśnienia tętniczego, jak i ewentualnych interwencji terapeutycznych.

Doktorant Patrycjusz Kołodziejczyk podszedł do tego problemu w bardzo ciekawy i oryginalny sposób. Stosując sprawdzony, klasyczny warsztat badawczy przeprowadził eksperymenty *in vivo* na szczurach oraz *in vitro* na hodowlach komórek śródbłónka (HUVEC) aby ocenić ekspresję receptorów MR w aorcie oraz sercu w wybranych stanach patologicznych, którym towarzyszyły zmiany w stężeniu aldosteronu. Dodatkowo podjął próbę oceny zależności między ekspresją receptorów MR i stężeniem aldosteronu a zmianami o podłożu prooksydacyjnym i profibrotycznym w tych tkankach.

Przedstawiona do recenzji praca ma klasyczny układ, liczy 104 strony, wyniki podsumowane są w siedmiu tabelach i na 12 rycinach. Piśmiennictwo nowoczesne i dobrze dobrane świadczy o dogłębnej wiedzy Doktoranta na temat poruszanego zagadnienia. Praca napisana jest ładnym językiem, co powoduje, iż czyta się ją łatwo, pomimo mnogości interwencji farmakologicznych, służących do udokumentowania przedstawionych tez.

We wstępie Autor szczegółowo omawia współczesną wiedzę na temat RAA, receptorów MR oraz efektów działania aldosteronu na układ sercowo-naczyniowy oraz funkcję śródbłónka. Prowadzi to Doktoranta do zadania podstawowego pytania, będącego tematem jego dysertacji, a mianowicie określenia poziomu ekspresji receptorów MR w aorcie sercu szczura w stanach cukrzycy, po zastosowaniu eplerenonu oraz obustronnej adrenalectomii jak również wpływu aldosteronu i receptorów MR na równowagę oksydo-redukcyjną i aktywność prolidazy. Odpowiedzi na to pytanie poszukuje, łącząc w oryginalny sposób osiągnięcia inżynierii genetycznej i klasyczny warsztat farmakologii doświadczalnej.

W serii eleganckich i złożonych eksperymentów dokumentuje podstawową tezę swej pracy, iż w stanach, którym towarzyszą zmiany w stężeniu aldosteronu występują też zmiany w ekspresji receptora MR w układzie sercowo-naczyniowym, szczególnie widoczne w sercach szczurów, u których indukowano cukrzycę.

Szczególnie interesujące wydają się być wyniki wykazujące, że wzrost stężenia aldosteronu we krwi prowadzi do zjawiska *down-regulation* i spadku ekspresji receptora MR w sercu szczura. Co więcej, zastosowanie eplerenonu, powodowało istotne obniżenie ekspresji receptora MR zarówno w sercu jak i aorcie a ponadto, ograniczyło także indukowany aldosteronem stres oksydacyjny, co związane było ze wzrostem biodostępności NO.

Z kolei wyniki eksperymentów *in vitro* wykazały niekorzystny wpływ hiperglikemii oraz podwyższonego stężenia aldosteronu na komórki śródbłónka, wyrażone zmniejszeniem biodostępności tlenu azotu i nasileniem stresu oksydacyjnego. Wyniki tego badania są tym ważniejsze, iż skuteczność blokerów aldosteronu w leczeniu niewydolności serca u ludzi jest udowodniona, a mechanizm tego korzystnego działania ciągle nas frapuje.

Podsumowując, wyciągnięte przez Autora wnioski są dobrze udokumentowane i wpływają wprost z uzyskanych wyników. Dyskusja poprowadzona jest warto, ze znawstwem tematu. Omawia w sposób wielostronny uzyskane wyniki, wiążące się z tym wątpliwości, oraz możliwe implikacje praktyczne (terapeutyczne) wynikające z przeprowadzonych eksperymentów. Autor słusznie, z dużą ostrożnością odnosi się do wyników i hipotezy dotyczącej powiązania zmian ekspresji receptorów MR ze zmianami o

podłożu profibrotycznym w sercu i naczyniach krwionośnych z uwagi na nieliczną ilość próbek oraz metodykę badania.

Warto podkreślić że przedstawiona do recenzji PRACA DOKTORSKA powstała w renomowanym ośrodku - Zakładzie Analizy i Bioanalizy Leków oraz Zakładzie Biofarmacji Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku . Znany z wielu publikacji i pionierskich prac warsztat badawczy białostockiego ośrodka stanowi podstawę najwyższej jakości recenzowanej pracy.

Co więcej, wyniki rozprawy doktorskiej zostały częściowo opublikowane w trzech oryginalnych, spójnych tematycznie artykułach opublikowanych w ważnych, międzynarodowych czasopismach : *Experimental Biology and Medicine*, *Current Drug Targets*, and *Cells* o łącznym wskaźniku IF= 11,93. W jednej z tych publikacji Doktorant jest pierwszym a w pozostałych trzecim i czwartym współautorem, co dowodzi jego istotnego i znaczącego wkładu pracy.

Korzystając z możliwości przedyskutowania pewnych aspektów przedstawionej pracy z dobrze wykształconym farmakologiem, chciałbym też sformułować kilka pytań i wątpliwości.

Po pierwsze, w informacji zamieszczonej w rozdziale „Materiały i Metody” jest podane że badanie przeprowadzone było na 62 szczurach, natomiast w wynikach i tabelach ilość próbek objętych analizą wynosi 42 ( skąd wynika taka różnica?).

Czy liczba 6 próbek badanych parametrów jest wystarczająca do sformułowania znamienne statystycznych wniosków?.

W oznaczeniach parametrów stresu oksydacyjnego użyto metody kolorymetrycznej oraz immunoenzymatycznej. Pomimo że są to uznane metody to jednak zastosowanie w tym wypadku wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) najpewniej wiązało by się z większą precyzją i dokładnością otrzymanych wyników. Co więcej, izoprostany są uznawane za jedne z najbardziej wiarygodnych wskaźników odzwierciedlających stres oksydacyjny organizmu i utlenienia lipidów, szczególnie z towarzyszącą cukrzycą, dlatego pomiar takich parametrów znacznie lepiej odzwierciedlałby stopień procesu peroksydacji.

Jak wynika z pracy poziom mRNA oksydazy NADPH i dysmutazy ponadtlenkowej (SOD) mierzono w aorcie szczurów metodą real-time PCR i tylko tą metodą genetyczną. Metoda ta jest bardzo czuła, ale można mieć wątpliwości czy stwierdzone zmiany mRNA rzeczywiście przekładają się na zmiany ekspresji białek enzymów, oraz aktywności tych enzymów, bo takich oznaczeń Doktorant nie wykonywał.

W przeprowadzonym badaniu zastosowanie infuzji aldosteronu u zwierząt po adrenalektomii i bez cukrzycy, prowadziło do zmniejszenia ekspresji receptorów MR, co

uznano za wynik zaskakujący. Autor jednak nie podejmuje próby wytłumaczenia i podania przyczyny tego zjawiska.

Z opisu na stronie 40 wynika, że po 2 tygodniach od zabiegu część zwierząt była poddawana kolejnym procedurom (indukcja cukrzycy, podanie aldosteronu i eplerenonu), pozostałe zwierzęta ponownie usypiano w celu pobrania krwi i tkanek do dalszej analizy. Brakuje informacji odnośnie liczby szczurów włączonych do danej procedury.

Na stronie 41 pracy Autor stwierdza, że jedynie zwierzęta, u których stwierdzono stężenie glukozy we krwi  $> 200$  mg/dl, były kwalifikowane do dalszych badań. Po 2 tygodniach od indukcji cukrzycy część zwierząt była poddawana kolejnym procedurom (podanie aldosteronu i eplerenonu), pozostałą część zwierząt ponownie usypiano w celu pobrania krwi i tkanek do dalszej analizy. Również, brakuje informacji ile takich zwierząt było kwalifikowanych, ile zostało poddanych dalszym etapom badania.

Po pobraniu tkanek i zakończeniu badań zwierzęta poddano eutanazji - w jaki sposób dokonano eutanazji tych zwierząt?

Już tylko z obowiązku recenzenta chciałem zwrócić uwagę na pewne redakcyjne drobne pomyłki jak:

- strona 14: bony komórkowe => błony komórkowe
- strona 22: w legendzie brak opisu :  $Mg^{2+}$  - jony magnezu
- strona 39: zwierzęta zostały podzielone na grupy – brak jasnej informacji ile konkretnie danych zwierząt trafiło do danej grupy.
- strona 61 ( w warunkach normoglikemii - zamiast hiperglikemii)
- strona 72: o roli jaką pełni aldosteron; rolę można odgrywać, pełnić można funkcję, nie związanej z nadnerczami => niezwiązanej z nadnerczami
- strona 85: Theadministration => The administration

Te pytania i uwagi w niczym nie umniejszają wartości przedstawionej do recenzji pracy, którą uważam za szczególnie interesującą, wartościową i oceniam bardzo wysoko. Praca ta świadczy o zdolności Autora do prowadzenia badań naukowych, biegłej znajomości skomplikowanego warsztatu laboratoryjnego, samodzielności i dużej erudycji naukowej. Stąd z prawdziwą przyjemnością wnoszę o dopuszczenie mgr farm. Patrycjusza Kołodziejczyka do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Wnoszę jednocześnie o wyróżnienie powyższej dysertacji doktorskiej.

