

Lublin, 8 sierpień 2018 r.

Ocena

pracy doktorskiej pt.

***„Wpływ inhibitora FAAH, URB597, na równowagę redoks oraz
mediatory lipidowe w organizmie szczurów z nadciśnieniem
pierwotnym i wtórnym ”***

mgr Michała Biernackiego

**wykonanej w Zakładzie Chemii Nieorganicznej i Analitycznej
Wydz. Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej**

Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku

Promotor: Prof. dr hab. Elżbieta Skrzydlewska

Promotor pomocniczy: dr Wojciech Łuczaj

Powszechnie uznaje się, że nadciśnienie tętnicze jest ciągle głównym czynnikiem ryzyka chorób sercowo-naczyniowych, naczyniowo-mózgowych oraz tętnic obwodowych. W patogenezie tych schorzeń niewątpliwie szkodliwą rolę odgrywa nadprodukcja reaktywnych form tlenu (RFT) w komórkach. Zmiany wywołane stresem oksydacyjnym stanowią potencjalne zagrożenie dla prawidłowego funkcjonowania śródbłonna naczyń krwionośnych w nadciśnieniu. W regulacji równowagi redoks biorą udział m.in. receptory kannabinoidowe (CB₁, CB₂ oraz TRPV1), których endogennym agonistą jest anandamid (AEA), pochodna amidowa kwasu arachidonowego. Niezależnie od receptorów, endokannabinoidy mogą uczestniczyć w procesach metabolicznych. Dlatego też główny wysiłek wielu badaczy koncentruje się na poznawaniu biosyntezy i katabolizmu endokannabinoidów oraz ich roli w regulacji procesów fizjologicznych jak też patologicznych. Zwraca się uwagę na inhibitory metabolizmu AEA szczególnie serynowe hydrolazy

amidów kwasów tłuszczowych tj. FAAH oraz URB597 enzym który modyfikuje miejsce aktywne FAAH.

Dane literaturowe, a także wcześniejsze prace Autora dotyczące zwiększonej ekspresji układu endokannabinoidowego w regulacji ciśnienia krwi były inspiracją do podjęcia badań przez Pana mgr Michała Biernackiego.

Problematyka recenzowanej przeze mnie pracy dotyczy wpływu przewlekłego podawania inhibitora FAAH, URB597, na równowagę redoks metabolizm fosfolipidów powstających w reakcjach zależnych od RFT i reakcji enzymatycznych oraz poziom mediatorów lipidowych w narządach mięsnych (wątrobie i nerkach) szczurów z nadciśnieniem pierwotnym i wtórnym. Co więcej, Doktorant postawił sobie ambitne zadanie wyjaśnienia czy uzyskane zmiany metaboliczne indukowane URB597 zależą od typu nadciśnienia i w jaki sposób.

Temat pracy podjęty przez Doktoranta jest interesujący i zawiera zarówno aspekty poznawcze jak i aplikacyjne.

Oceniana dysertacja została przedstawiona w dwustronnie napisanym bardzo starannym wydruku komputerowym. Na uwagę zasługuje ciekawy układ pracy, który składa się z 10 Rozdziałów: 1. Wstęp; 2. Cel Pracy; Rozdział 3 to publikacja przeglądowa; kolejne 4 do 6 stanowią 3 oryginalne prace. Wszystkie zostały opublikowane w indeksowanych czasopismach o łącznym IF=12,182 w których Doktorant jest pierwszym Autorem, a wiarygodność potwierdzili współautorzy w załączonych oświadczeniach.

Kolejne Rozdziały 7, 8 i 9 to Dyskusja, Wnioski i Streszczenie. Końcowy rozdział 10 stanowi Lista publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej.

W zwięzłym Wstępie, Autor na podstawie literatury opisał nadciśnienie tętnicze, udział stresu oksydacyjnego w rozwoju

nadciśnienia i chorób układu sercowo-naczyniowego oraz w metabolizmie fosfolipidów błonowych i poziomie mediatorów lipidowych tj. endokannabinoidów. Następnie omówił serynowe hydrolazy amidowe kwasów tłuszczowych (FAAH), które katalizują hydrolizę anandamidu oraz inhibitor FAAH tj. URB597.

Z powyższych danych wynika syntetycznie sprecyzowany Cel Pracy.

Praca przeglądowa (Rozdział 3) jest teoretycznym wprowadzeniem do tematyki dysertacji. Szczegółowo opisano w niej biosyntezę i metabolizm endokannabinoidów oraz ich rolę w aktywacji receptorów. Z publikacji tej jasno wynika, że zaburzenie homeostazy w układzie endokannabinoidowym prowadzi do rozwoju różnorodnych chorób m.in. układu krążenia.

Materiał , metodyka badań oraz wyniki recenzowanej dysertacji zostały starannie przedstawione w 3 oryginalnych opublikowanych pracach (Rozdziały 4-6), które ilustrują cały przebieg pracochłonnych zadań. Zwracam uwagę, że powyższe prace zostały ocenione merytorycznie przez Recenzentów i wyróżnione opublikowaniem ich w czasopiśmie o wysokim IF.

W publikacji Rozdziału 4 opisano pierwszy schemat doświadczeń, które przeprowadzono na szczurach (4-5 tyg.), samcach szczepu Wistar z nadciśnieniem wtórnym wywołanym przez jednostronną nefrektomię . Po tygodniu adaptacji podawano przez 6 tygodni s.c. octan 11-deoksykortykosteronu (DOCA). W dwóch ostatnich tygodniach zwierzęta dostawały i.p. co 12 godz. URB 597. Przez cały okres trwania doświadczeń szczury dostawały do picia 1% roztwór chlorku sodu. W homogenatach wątroby w/w zwierząt oznaczono parametry biochemiczne tj. poziom ROS, aktywność enzymów pro- i anty- oksydacyjnych, stężenie 8-hydroksy-2-2'-deoksyguanozyny(8-OHdG),

endokannabinoidów , isoprostanów , neuroprostanów, ekspresji białek oraz aktywność FAAH , lipazy monoacyloglicerolu (MAGL) i fosfolipazy.

W kolejnej pracy (Rozdział 5) zamieszczono drugi schemat badań. Doświadczenia prowadzono na szczurach samcach z nadciśnieniem pierwotnym (SHR_s) i normotensyjnych Wistar-Kyoto (WKY). Zwierzętom obu grup podawano i.p. URB597 co 12 godz. przez 14 dni. Następnie w homogenatach wątroby tych szczurów oznaczono parametry biochemiczne tj. aktywność enzymów pro- i anty-oksydacyjnych, ekspresję białek metodą western blot, poziomy nie-enzymatycznych antyoksydantów, fosfolipidów i wolnych kwasów tłuszczowych , grup karbonylowych oraz endokannabinoidów. Oznaczano też aktywność cyklooksygenaz (COX1 i COX2) .

Uwagę zwraca publikacja, której IF=6,337 (Rozdział 6 w dysertacji). W pracy tej opisano doświadczenia przeprowadzone na szczurach z nadciśnieniem pierwotnym jak też wtórnym, którym podawano i.p. URB597 co 12 godz. przez 14 dni. Następnie w homogenatach bądź pulweryzatach nerek oznaczono parametry biochemiczne tj. aktywność enzymów odpowiedzialnych za generację RFT , enzymów anty-oksydacyjnych, ekspresję białek metodą western blot, poziomy nie-enzymatycznych antyoksydantów, fosfolipidów i wolnych kwasów tłuszczowych, grup karbonylowych ,tryptofanu oraz endokannabinoidów a także aktywność FAAH.

Istotnym elementem stosowanej przez Doktoranta metodyki badań w w/w pracach było oznaczenie różnorodnych parametrów biochemicznych w materiale biologicznym przy zastosowaniu nowoczesnych technik charakteryzujących się wysoką czułością oraz powtarzalnością. Przeprowadzone doświadczenia dostarczyły wielu oryginalnych i interesujących obserwacji .

Uzyskane wyniki poszerzyły i pogłębiły wiedzę dotyczącą zależności pomiędzy nadciśnieniem tętniczym a układem endokannabinoidowym.

Na podkreślenie umiejętności badawczych mgr Michała Biernackiego zasługuje Dyskusja (Rozdział 10 w dysertacji). Doktorant, krok po kroku analizował otrzymane wyniki dotyczące wpływu wielokrotnie stosowanego inhibitora FAAH, URB597 na równowagę redoks oraz mediatory lipidowe w organizmie szczurów z nadciśnieniem pierwotnym jak i wtórnym poddanym działaniu URB597. Wyniki porównywał i omawiał w oparciu o fakty z umiejętnie dobranego piśmiennictwa. Doktorant wykazał zwiększenie poziomu endokannabinoidów (tj.anandamidu, AEA oraz 2-arachidonyloglicerolu, 2-AG) w nerce i wątrobie szczurów z nadciśnieniem pierwotnym jak i wtórnym poddanym działaniu URB597. Autor stwierdził, że URB597 jest niespecyficznym inhibitorem FAAH bowiem hamuje również aktywność lipazy monoacyloglicerolu odpowiedzialnej za degradację 2-AG.

Konsekwencją podwyższonego poziomu anandamidu były zmiany w ekspresji receptorów CB₁ i CB₂ oraz TRPV1, zależne od narządu i rodzaju nadciśnienia. Po podaniu URB597 Doktorant zaobserwował obniżenie ekspresji receptorów CB₁ w nerce szczurów z nadciśnieniem wtórnym ale zwiększenie ekspresji tych receptorów w nerce zwierząt z nadciśnieniem pierwotnym a także wątrobie szczurów z nadciśnieniem wtórnym. Zdaniem Autora przyczyną mogła być tylko skłonność tego inhibitora do obniżenia ciśnienia krwi u szczurów z nadciśnieniem pierwotnym jak też wtórnym.

Nasilenie ekspresji receptorów CB₁ powodowało zaburzenia w systemie antyoksydacyjnym w szczególności w poziomie/aktywności przeciwutleniaczy biorących udział w ochronie fosfolipidów. Zwiększona

peroksydacja fosfolipidów indukowała zmiany metaboliczne w wątrobie i nerkach badanych zwierząt.

Natomiast zwiększenie ekspresji receptorów CB₂ sprzyjało hamowaniu enzymów prooksydacyjnych co w konsekwencji było efektem obniżenia poziomu RFT. Po wielokrotnym podaniu URB597 notowano zwiększenie poziomu antyoksydantów nieenzymatycznych w nerce szczurów z nadciśnieniem pierwotnym jak też wtórnym. Autor wykazał różnice w aktywności enzymów odpowiedzialnych za ochronę fosfolipidów błonowych przed działaniem RFT oraz enzymów odpowiedzialnych za metabolizm RFT w nerce szczurów z nadciśnieniem wtórnym i pierwotnym poddanych działaniu tego inhibitora.

Doktorant obserwował także zmiany ekspresji aktywatorów oraz inhibitorów czynnika transkrypcyjnego Nrf2 ale brak ekspresji Nrf2 w badanych narządach mięsnych szczurów z nadciśnieniem pierwotnym i wtórnym poddanych działaniu URB 597.

Różnorodny przekrój wyników wskazuje na specyficzność działania inhibitora FAAH, URB597 w nadciśnieniu pierwotnym i wtórnym u szczurów. W podsumowaniu Dyskusji Autor słusznie stwierdził, że URB597 nie może być sugerowany w terapii nadciśnienia u ludzi, ponieważ nie wykazywał hipotensyjnego efektu oraz indukował zaburzenia metaboliczne w homeostazie wątroby i nerek szczurów z nadciśnieniem pierwotnym i wtórnym.

Przeprowadzona dojrzała dyskusja naukowa jak też 6 logicznych wniosków, które kończą dysertację wskazują na głęboką wiedzę w zakresie problematyki ocenianej przeze mnie rozprawy.

Moje pojedyncze, dyskusyjne uwagi dotyczą niepoprawnych sformułowań tj. 1) „skutkowało zaistnieniem stresu oksydacyjnego” (str.136); 2) proponuję używać jednej, najlepiej formy bezosobowej „zaobserwowano” zamiast „zaobserwowaliśmy” czy „zaobserwowałem”;

- 3) „sprzyja zachodzeniu reakcji Fentona” poprawnie ...powstawaniu...
4) zamiast „chronicznemu podawaniu” proponuję używać wielokrotnemu
Lub po prostu 14-dniowemu.

Powyższe uwagi nie wpływają istotnie na merytoryczny poziom recenzowanej przeze mnie pracy.

Przedstawioną do recenzji dysertację oceniam **bardzo dobrze**
I wnioskuję o jej wyróżnienie. Jest ona rzetelnym i poważnym dorobkiem naukowym mgr Michała Biernackiego. Wnosi szereg nowych danych dotyczących wpływu nadciśnienia na równowagę redoks oraz układ endokannabinoidowy. Poza aspektem poznawczym ma też wartości praktyczne. Autor sugeruje, że z uwagi na brak skuteczności inhibitora FAAH, URB597 w nadciśnieniu pierwotnym i wtórnym u szczurów oraz ryzyko zaburzeń metabolicznych w wątrobie i nerkach, inhibitor ten nie powinien być stosowany w terapii nadciśnienia u ludzi.

Moim zdaniem dysertacja doktorska mgr Michała Biernackiego spełnia wszystkie wymagania stawiane rozprawom na stopień doktora. Na tej podstawie mam zaszczyt przedstawić Wysokiej Radzie Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej UM w Białymstoku wniosek o dopuszczenie Doktoranta do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Wójtowia Ewa
Prof. dr hab. Ewa Jagiełło-Wójtowicz