

dr hab. n. farm. Joanna Folwarczna
Katedra i Zakład Farmakologii
Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej
Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr farm. Ewy Oksztulskiej-Kolanek pt. „STĘŻENIE
OBWODOWEJ SEROTONINY, A WŁAŚCIWOŚCI BIOMECHANICZNE
I METABOLIZM KOŚCI W PRZEWLEKŁEJ NIEWYDOLNOŚCI NEREK
U SZCZURA”**

Pani mgr farm. Ewa Oksztulska-Kolanek przygotowała swoją rozprawę doktorską pt. „Stężenie obwodowej serotoniny, a właściwości biomechaniczne i metabolizm kości w przewlekłej niewydolności nerek u szczura” pod kierunkiem Pani prof. dr hab. n. med. Krystyny Pawlak w Zakładzie Farmakoterapii Monitorowanej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku.

Zagadnienia podjęte w pracy mają istotne znaczenie, ponieważ przewlekła choroba nerek (PChN) prowadzi do wielu zaburzeń ogólnoustrojowych, między innymi dotyczących gospodarki mineralnej i układu kostnego. Zaburzenia mineralne i kostne, które objawiają się nieprawidłowymi wynikami dotyczącymi gospodarki wapniowo-fosforanowej, zaburzeniami w obrębie układu kostnego i występowaniem złapnień pozaszkieletowych, mogą wystąpić już we wczesnych stadiach choroby. Z punktu widzenia układu kostnego, kluczowe znaczenie ma takie postępowanie lecznicze, które pozwoli na zapobieganie złamaniom kości.

Metabolizm wapniowo-fosforanowy pozostaje pod ścisłą kontrolą endokrynnych, parakrynnych i autokrynnych układów regulacyjnych; coraz więcej wiadomo także o znaczeniu oddziaływań nerwowych. Powszechnie wiadomo, że w PChN dochodzi do zaburzenia wydzielania czynnika wzrostu fibroblastów 23, aktywnej postaci witaminy D₃ i parathormonu, co prowadzi m.in. do zmian wydzielania czynników parakrynnych (takich jak RANKL, OPG, sklerostyna) przez komórki kostne, i znaczących zmian w procesach wzrostu i przebudowy kości. Problemem w badaniach zaburzeń mineralno-kostnych w PChN jest to, że ich charakter może się zmieniać wraz z rozwojem choroby, a zaburzenia mineralizacji kości mogą być związane ze zmniejszonym lub zwiększonym tempem przemian metabolicznych. Powszechnie stosowane badania densytometryczne kości mają ograniczone znaczenie w przypadku powikłań PChN, ponieważ w większości badań prowadzonych w bardziej zaawansowanych stadiach choroby nie udało się wykazać takiego związku między gęstością mineralną kości z częstością złamań jak w populacji ogólnej. Jakość kości ulega jednak pogorszeniu, czego wyrazem jest zwiększanie się częstości złamań wraz z progresją PChN. Z tych powodów szczególną rolę w poznaniu charakteru zaburzeń układu kostnego w tym

schorzeniu ogrywają badania w zwierzęcych modelach eksperymentalnych przewlekłej niewydolności nerek (PNN).

Badania prowadzone w ostatnim dziesięcioleciu wykazały, że w regulacji procesów wzrostu i przebudowy kości uczestniczy serotonina, jakkolwiek charakter jej oddziaływań na układ kostny nie został jednoznacznie wyjaśniony. Od dawna wiadomo również, że w PChN może dochodzić do zmian poziomu serotoniny we krwi. **W związku z tym podjęta w pracy doktorskiej mgr Oksztulskiej-Kolank próba powiązania oceny rozwoju zaburzeń układu kostnego w modelu zwierzęcym przewlekłej niewydolności nerek z badaniami zmian w poziomie serotoniny, jej prekursora – tryptofanu i metabolitu – kwasu 5-hydroksyindolooctowego, była całkowicie zasadna. Należy tu podkreślić prekursorski charakter podjętych w pracy doktorskiej badań.**

Tytuł rozprawy doktorskiej mgr farm. Ewy Oksztulskiej-Kolank ściśle odzwierciedla jej zakres. Rozprawa składa się z rozbudowanej części teoretycznej (przeglądu piśmiennictwa) oraz z części doświadczalnej wraz z opisem i dyskusją wyników.

Liczącą ogółem 108 stron pracę poprzedza półtorastronicowy wstęp, stanowiący krótkie wprowadzenie do zagadnień podjętych w pracy, którego kontynuację i uściślenie przedstawiono w jednostronicowym rozdziale drugim „Cel pracy”. W rozdziale pierwszym, liczącym 34 strony, dokonano przeglądu piśmiennictwa związanego z tematyką pracy. Schemat doświadczenia oraz zastosowane metody badawcze i materiały zostały opisane w 13-stronicowym rozdziale trzecim, zatytułowanym „Część doświadczalna”. W kolejnym, 16-stronicowym rozdziale przedstawiono uzyskane wyniki, które następnie przedyskutowano w 7-stronicowym rozdziale „Dyskusja”. Pracę podsumowuje 5 wniosków, po których znajdują się streszczenia pracy w języku polskim i angielskim, spis piśmiennictwa liczący 220 pozycji, wykaz tabel i wykaz rycin. Rozprawa zawiera 10 tabel (w tym 7 dotyczących danych literaturowych i 3 przedstawiające uzyskane wyniki) oraz 17 rycin (z czego 8 w rozdziale wprowadzającym, 2 w części metodycznej i 7 przedstawiających wyniki). Praca zawiera także spis treści i wykaz zastosowanych skrótów.

Omówię teraz główne części rozprawy, przedstawiając swoje uwagi.

I Część teoretyczna

W pierwszej połowie części teoretycznej Doktorantka szczegółowo opisała PChN, przedstawiając aktualną definicję, kryteria diagnostyczne, podział na stadia kliniczne, a także liczne powikłania. Najwięcej uwagi poświęciła zaburzeniom mineralno-kostnym, związanym bezpośrednio z tematem pracy doktorskiej. Na szczególne podkreślenie zasługuje analiza przydatności poszczególnych markerów metabolizmu kostnego do oceny zmian zachodzących w układzie kostnym chorych z PChN, stanowiąca uzasadnienie wyboru wykorzystanych następnie w pracy wskaźników: fosfatazy zasadowej i izoenzymu 5b winianoopornej fosfatazy kwaśnej. Doktorantka przedstawiła następnie aktualnie stosowane modele zwierzęce PNN, w tym zastosowany model subtotalnej nefrektomii 5/6.

Drugą połowę części teoretycznej Doktorantka poświęciła zagadnieniom bezpośrednio związanym z badaniami przeprowadzonymi w wybranym modelu doświadczalnym. Zwiąże przedstawiła budowę i funkcję kości, a także procesy przebudowy kości, bez szczegółowego

opisu ich regulacji. Ostateczną miarą jakości kości jest jej wytrzymałość na złamania. Doktorantka przedstawiła aktualnie stosowane metody badań kości u ludzi (densytometryczne, tomograficzne, histomorfometryczne czy dotyczące składu macierzy kostnej i mineralizacji), dostarczające danych mogących jedynie pośrednio sugerować zmiany wytrzymałości kości. Biorąc pod uwagę, że praktycznie nie jest możliwe prowadzenie badań wytrzymałościowych na materiale pozyskanym podczas biopsji kości, jedynym bezpośrednim sposobem oceny zmian wytrzymałości kości rozwijających się pod wpływem chorób lub stosowania leków są badania właściwości mechanicznych kości w zwierzęcych modelach eksperymentalnych. Z tego zapewne powodu bardzo rozbudowany został podrozdział poświęcony badaniom wytrzymałościowym kości. Należy zauważyć, że ten fragment pracy został już przez Doktorantkę opublikowany w czasopiśmie "Nephron" (pozycja literaturowa 150).

Ostatnią część wprowadzenia Doktorantka poświęciła serotoninie, przedstawiając jej syntezę, metabolizm, dystrybucję, funkcje w ustroju oraz dotychczasowy stan badań w zakresie wpływu na układ kostny. Na pochwałę zasługuje wybór zagadnień przedstawionych w tej części pracy. Autorka zwróciła uwagę na brak spójności wyników dotychczasowych badań w zakresie działania serotoniny na układ kostny, co zresztą moim zdaniem znalazło potwierdzenie w przedstawianej pracy.

Uwagi do rozdziału I:

1. Dla opisu badanych właściwości mechanicznych kości Autorka używa określenia "właściwości strukturalne", co może być mylące, bo kojarzy się z badaniami struktury kości, których nie prowadzono. Jednoznaczne byłoby np. określenie "właściwości mechaniczne strukturalne".
2. Analizując przebieg krzywej zależności siła-przemieszczenie (lub naprężenie-odkształcenie), określa się wartości badanych parametrów w charakterystycznych punktach, najczęściej w granicy plastyczności (*yield point*) i w punkcie działania maksymalnej siły (*ultimate load, maximum load* - F_u), która jest odpowiedzialna za złamanie kości. Autorka następująco opisała zachodzące w kości zjawiska: „Po przekroczeniu wartości siły F_y odkształcenie staje się nieodwracalne. Natomiast dalsze zwiększanie przyłożonej siły powyżej wartości F_u prowadzi do złamania badanej kości” (str. 42). Opisując wyznaczone na podstawie krzywej zależności siły od przemieszczenia parametry wytrzymałościowe (str. 43), Doktorantka zastosowała jednak niewłaściwe polskie nazewnictwo dla siły w granicy plastyczności, określając ją jako „maksymalną siłę nacisku wytrzymywaną przez kość”. Z kontekstu wynika, że miała na myśli „maksymalną siłę nacisku nie wywołującą nieodwracalnych odkształceń w kości”, ponieważ uściśliła zastosowany termin, dodając: „siła powodująca pierwsze widoczne załamanie liniowości na wykresie zależności siła-odkształcenie”. Określenie „maksymalna siła nacisku wytrzymywana przez kość” nie jest prawidłowe, ponieważ jest nią siła maksymalna (F_u). Konsekwentnie, ugięcie w granicy plastyczności [$dl(F_y)$] Doktorantka opisała jako „ugięcie przy maksymalnej sile nacisku”. Tych określeń Doktorantka używała w kolejnych rozdziałach pracy. Zastosowanie niewłaściwego nazewnictwa polskiego nie wiąże się jednak z ryzykiem błędnego zrozumienia opisu i niewłaściwej interpretacji wyników, ponieważ każdorazowo używane były jednoznaczne skróty określeń w języku

angielskim.

II Część doświadczalna – materiały i metody

Badania stanowiące podstawę rozprawy doktorskiej przeprowadzono na 40 młodych szczurach samcach. U 24 szczurów wywołano eksperymentalną PNN w wyniku przeprowadzenia subtotalnej nefrektomii (usunięcie 5/6 kory lewej nerki i po tygodniu całej prawej nerki), a u pozostałych 16 szczurów kontrolnych przeprowadzono operacje pozorne. Zwierzęta uśmiercono po upływie 1 lub 3 miesięcy od wywołania PNN. Do badań wykorzystano surowicę krwi oraz lewe kości udowe. Oceny stopnia niewydolności nerek dokonano na podstawie poziomu kreatyniny i azotu mocznikowego w surowicy krwi. W surowicy krwi oznaczono stężenie tryptofanu, serotoniny i kwasu 5-hydroksyindolooctowego za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczerwowej (HPLC). Aktywność przemian metabolicznych układu kostnego oceniono na podstawie oznaczenia aktywności izoenzymu 5b winianoopornej fosfatazy kwaśnej (TRAP5b) metodą immunoenzymatyczną ELISA (wskaźnik resorpcji kości) oraz fosfatazy alkalicznej metodą kinetyczną przy użyciu spektrofлуorymetru. Oznaczono także poziom wapnia i fosforu nieorganicznego w surowicy. Wyizolowane kości zważono, a następnie zbadano ich jakość, przeprowadzając pomiary parametrów wytrzymałościowych trzonu kości udowej (kość o utkaniu zbitym) oraz szyjki kości udowej (kość o utkaniu zbitym z komponentą kości gąbczastej): sztywności, siły i ugięcia w granicy plastyczności oraz maksymalnej siły, odpowiadającego jej ugięcia oraz energii pochłoniętej przez kość. Uzyskane wyniki poddano dogłębnej analizie statystycznej, z wykorzystaniem dwuczynnikowej analizy wariancji z testem *post-hoc* Bonferroniego, oraz ze zbadaniem występowania korelacji między analizowanymi zmiennymi za pomocą współczynnika korelacji rang Spearmana.

Uwagi i pytania do części metodycznej:

1. Dlaczego w grupach szczurów operowanych pozornie (kontrolnych) i grupach szczurów z niewydolnością nerek była różna liczba osobników? Czy nie było żadnych strat związanych z zabiegami chirurgicznymi?
2. Na str. 51 i 52 napisano omyłkowo “dodawano po 10 µl surowicy badanej i/lub 1000 µl wzorca”, podczas gdy objętości te na pewno były takie same.
3. Odnosnie badań wytrzymałościowych szyjki kości udowej, zastosowane badanie nie było typowym testem zginania. W takim przypadku, zamiast określenia „ugięcie”, właściwym terminem jest „przemieszczenie”. Oczywiście nie wpływa to na proces wnioskowania.

W przyszłości radziłabym wykonywać badania wytrzymałościowe szyjki kości udowej w kościach kontralateralnych w stosunku do kości, w których uprzednio przeprowadzono badanie trzonu, ponieważ podczas łamania trzonu struktura szyjki może ulegać uszkodzeniu z powodu znacznych naprężeń.

Zastosowane metody badawcze pozwoliły na zrealizowanie celu pracy, tj. na próbę określenia związków między zmianami poziomu serotoniny i zaburzeniami metabolizmu tkanki kostnej, a w konsekwencji jakości kości w PNN nerek u szczura.

III Wyniki

Doktorantka wykazała, że PNN wywołała u szczurów nasilenie przemian obwodowej

serotoniny, przejawiające się zwiększeniem poziomu serotoniny i kwasu 5-hydroksyindolooctowego, a także stosunków stężeń produkt/substrat (serotonina/tryptofan i kwas 5-hydroksyindolooctowy/serotonina) w surowicy krwi. Wystąpiło także pogorszenie właściwości mechanicznych kości udowej. Zmiany te w większym stopniu dotyczyły szyjki niż trzonu kości udowej. Nie stwierdzono istotnych różnic w aktywności badanych biochemicznych wskaźników resorpcji kości i kościotworzenia pomiędzy badanymi grupami. Najważniejszą i najciekawszą część pracy stanowią analizy korelacji pomiędzy wartościami parametrów związanych z przemianami serotoniny obwodowej a parametrami układu kostnego. Badania te wykazały m.in. występowanie dodatniej korelacji między stężeniami serotoniny i kwasu 5-hydroksyindolooctowego a aktywnością fosfatazy zasadowej (markera kościotworzenia) u szczurów z PNN, i przeciwnie, występowanie ujemnej korelacji między stężeniem kwasu 5-hydroksyindolooctowego a aktywnością fosfatazy zasadowej u szczurów zdrowych. Na podstawie analizy korelacji pomiędzy aktywnością badanych wskaźników metabolizmu kostnego a wyznaczonymi parametrami wytrzymałościowymi Doktorantka stwierdziła, że nasilenie kościotworzenia w PNN związane jest ze zmniejszeniem sztywności kości (zwiększeniem jej elastyczności). Przeprowadzone analizy pozwoliły także na sugestię, że obwodowa serotonina, w wyniku nasilania kościotworzenia, znacząco modyfikuje wytrzymałość kości udowej szczurów z PNN, oraz że działanie serotoniny może być korzystne, szczególnie w odniesieniu do szyjki kości udowej.

Uwagi do opisu wyników:

1. Autorka stwierdziła, że „Dwuczynnikowa ANOVA wykazała, że zarówno wiek, jak i PNN w sposób niezależny i istotny statystycznie wpływają na podwyższone stężenia kreatyniny i BUN”. Zdanie to jest prawdziwe dla kreatyniny; z wiekiem wartość BUN zmniejszała się.
2. Autorka zdecydowała się przedstawiać uzyskane wyniki dotyczące wytrzymałości kości w przeliczeniu na masę ciała. Na wykresach i w tabelach Autorka zastosowała oznaczenie jednostek w formie [jednostka/m.c.] zamiast [jednostka/jednostka masy], np. [N/g]. Moim zdaniem nie trzeba było przeliczać sztywności na masę ciała, ponieważ jest to wartość pochodna siły i przemieszczenia (tangens kąta nachylenia krzywej zależności siła-przemieszczenie w zakresie odkształceń sprężystych).

IV. Dyskusja

Dyskusja pracy przeprowadzona została w sposób bardzo zajmujący. Doktorantka zaznaczyła, że wyniki pracy dotyczące wytrzymałości kości u szczurów z PNN są spójne z danymi literaturowymi, a następnie przedstawiła własną interpretację wykazanych związków między parametrami kostnymi a stężeniem serotoniny i jej metabolitu. Chociaż przeprowadzona dyskusja jest przekonująca, wydaje mi się, że uzyskane wyniki nie uzasadniają kategorycznego stwierdzenia, że „obwodowa serotonina, poprzez pobudzenie procesu kościotworzenia, wywiera odmienny, uzależniony od rodzaju tkanki kostnej, wpływ na procesy biomechaniczne kości udowej młodych szczurów z eksperymentalną PNN”. Uważam, że postawienie takiej tezy jedynie na podstawie występowania dodatniej korelacji między aktywnością wskaźnika kościotworzenia (ALP) a poziomem serotoniny w surowicy jest zbyt odważne. Zwiększenie aktywności ALP, jak sama Doktorantka napisała, cytując

pozycje literaturowe 11 i 128, jest raczej objawem niekorzystnych zmian w układzie kostnym; na ogół wynika z nasilenia kościotworzenia w odpowiedzi na nasiloną resorpcję. PNN nie wpływała istotnie na aktywność TRAP5b. Należy pamiętać, że aktywność TRAP5b w surowicy jest proporcjonalna do liczby osteoklastów. Np. u szczurów z doświadczną osteoporozą wywołaną niedoborem estrogenów poziom TRAP5b zmniejsza się ze względu na zmniejszoną masę kości (więc także liczbę osteoklastów), natomiast poziom fragmentów kolagenu uwalnianych podczas resorpcji zwiększa się. W przypadku PNN także mogło dojść do jedynie kompensacyjnego nasilenia aktywności osteoblastów, którego miarą było zwiększenie aktywności ALP.

Na podstawie przeprowadzonych badań i dyskusji wyników Doktorantka sformułowała 5 wniosków, z których dwa ostatnie uważam za bardzo odważne. Wniosek 4 („Nasilenie procesu kościotworzenia w PNN zmniejsza sztywność i poprawia elastyczność i plastyczność kości udowej w obu analizowanych rodzajach tkanki kostnej”) moim zdaniem mógłby brzmieć: „Nasilenie procesu kościotworzenia w PNN było związane ze zmniejszeniem sztywności i zwiększeniem elastyczności i plastyczności kości udowej”. Z kolei we wniosku 5 proponowałabym zmienić słowo „jest” na „może być” i skreślić słowo „szczególnie”: „Wpływ serotoniny może być korzystny w przypadku właściwości biomechanicznych szyjki kości udowej, które uległy znacznemu osłabieniu w przebiegu PNN.”

W pracy Doktorantka zacytowała 220 dobrze dobranych, w pełni aktualnych pozycji literaturowych. Tak jak cała praca, spis piśmiennictwa został bardzo starannie zredagowany. Chciałabym podkreślić, że w całym tekście zauważyłam jedynie kilka błędów literowych.

Z obowiązku recenzenta przedstawię kilka uwag o mniejszym znaczeniu:

1. Na str. 27 napisano „zaburzenia hemostazy” zamiast „homeostazy”.
2. Na ryc. 3 błędnie oznakowano kość beleczkową i korową.
3. Na str. 43 w opisie metabolizmu serotoniny napisano „5-hydroksoindolooctan” zamiast „aldehyd 5-hydroksoindolooctowy”.
4. Właściwym terminem jest „głowa kości udowej” (nie „główka”).

Przedstawione wyżej uwagi krytyczne nie wpływają na **moją zdecydowanie pozytywną ocenę rozprawy doktorskiej mgr farm. Ewy Oksztulskiej-Kolaneck**. Badania stanowiące podstawę pracy były celowe i przeprowadzone z wykorzystaniem właściwych metod. Stosunkowo skromny zestaw badań układu kostnego został moim zdaniem całkowicie zrównoważony precyzyjną analizą statystyczną uzyskanych wyników oraz bardzo dobrym, wnikliwym przeglądem literatury dotyczącej przedmiotu pracy. Autorka wykazała się dużą wiedzą teoretyczną. Praca została bardzo starannie zredagowana. Na podkreślenie zasługuje umiejętność zwięzłego przedstawiania złożonych zagadnień i skupienia się na kwestiach bezpośrednio dotyczących przeprowadzonych badań. Uzyskano interesujące wyniki, które mogą stanowić podstawę dalszych, pogłębionych badań nad rolą serotoniny w rozwoju zaburzeń układu kostnego w przebiegu przewlekłej niewydolności nerek.

Podsumowując, w moim przekonaniu rozprawa doktorska mgr farm. Ewy Oksztulskiej-Kolaneck spełnia ustawowe warunki do ubiegania się o stopień naukowy doktora

nauk farmaceutycznych. Mam zaszczyt przedstawić Pani Dziekan i Wysokiej Radzie Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku

WNIOSEK

o dopuszczenie mgr farm. Ewy Oksztulskiej-Kolanek do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

ADIUNKT

Katedry i Zakładu Farmakologii
Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach

Joanna Folwarczna
dr hab. n. farm. Joanna Folwarczna