

Sosnowiec, 11.03.2022r.

Ocena pracy doktorskiej pt.

***Ekspresja receptorów mineralokortykosteroidowych w układzie
sercowo-naczyniowym szczurów z cukrzycą***

wykonanej przez

mgr farm. Patrycjusza Kołodziejczyka

**w Zakładzie Analizy i Bioanalizy Leków oraz Zakładzie Biofarmacji
Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej
Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku**

**w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki
farmaceutyczne**

Katedra i Zakład Chemii
i Analizy leków

Wydział Nauk Farmaceutycznych
w Sosnowcu

Śląski
Uniwersytet Medyczny
w Katowicach

ul. Jagiellońska 4
41-200 Sosnowiec
www.chemialekow.sum.edu.pl

Dr hab.n.farm.
Artur Beberok, prof. SUM
tel.: (+48 32) 364 16 91
abeberok@sum.edu.pl

SEKRETARIAT
tel./fax: (+48 32) 364 16 11
chemlek@sum.edu.pl



HR EXCELLENCE IN RESEARCH

Aldosteron jest hormonem steroidowym nadnerczy, którego główną rolą jest utrzymywanie równowagi wodno-elektrolitowej organizmu, a w konsekwencji właściwego ciśnienia tętniczego krwi. W ostatnim czasie coraz większe zainteresowanie wzbudza patologiczne działanie aldosteronu w układzie sercowo-naczyniowym. Należy zwrócić uwagę, że mechanizm jego działania jest złożony i może dotyczyć zarówno szlaków genomowych jak i niegenomowych. Jednakże niezależnie od aktywowanych szlaków postuluje się, że główną rolę w mechanizmie działania aldosteronu odgrywają receptory mineralokortykosteroidowe (MR). Lokalna synteza aldosteronu w sercu i naczyniach krwionośnych wraz z występowaniem receptorów MR w tych strukturach może powodować, że aldosteron wykazuje swoje parakrynnie działanie w obrębie układu sercowo-naczyniowego, niezależnie od klasycznego – nerkowego działania. Wykazano, że aktywacja receptorów MR w układzie sercowo-naczyniowym odgrywa istotną rolę w zaburzeniach czynności serca i naczyń. Mechanizm tych zaburzeń związany jest między innymi z włóknieniem serca i ścian naczyń krwionośnych, dysfunkcją śródbłonna, nasilonym stresem oksydacyjnym i stanem zapalnym czy zaburzeniami homeostazy. Należy także podkreślić fakt, iż wiedza na temat rozmieszczenia receptorów MR w układzie sercowo-naczyniowym, a przede wszystkim zmian w ich ekspresji w przebiegu różnych stanów patologicznych, którym towarzyszą wahania stężenia aldosteronu, jest nadal fragmentaryczna.

Uzasadnionym zatem celem badań, przedłożonej do recenzji rozprawy doktorskiej mgr farm. Patrycjusza Kołodziejczyka, było określenie poziomu ekspresji receptorów MR w aorcie oraz sercu szczura w wybranych stanach patologicznych, którym towarzyszą zmiany w stężeniu aldosteronu. Ponadto, celem badań było również powiązanie zmian w ekspresji receptora MR w układzie sercowo-naczyniowym i stężenia aldosteronu ze zmianami o podłożu prooksydacyjnym i profibrotycznym.

Tytuł dysertacji Doktoranta został prawidłowo sformułowany i w pełni odzwierciedla cel badań. Wybór tematu pracy doktorskiej uważam za trafny, zgodny z kierunkiem współczesnych badań naukowych i aktualnym stanem wiedzy. Podejmowany problem uważam za uzasadniony, niezwykle ważny zarówno: i/ z punktu widzenia naukowego, ii/ znaczenia medycznego oraz iii/ społecznego, z uwagi na fakt iż aktywacja receptorów MR w układzie sercowo-naczyniowym odgrywa istotną rolę w indukcji zaburzeń czynności serca i naczyń – nadciśnienia, niewydolności serca, zawału mięśnia sercowego czy udaru mózgu.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska obejmuje 104 strony tekstu wraz z piśmiennictwem. Tekst pracy zawiera typowe dla opracowań naukowych rozdziały, z zachowaniem właściwych proporcji. Dodatkowo w pracy zamieszczono wykaz skrótów stosowanych w tekście pracy, co bardzo ułatwia ocenę dysertacji.

We Wstępie Doktorant w oparciu o obszerne piśmiennictwo przedstawił aktualną wiedzę z zakresu charakterystyki aldosteronu i mechanizmu jego działania. W kolejnych podrozdziałach scharakteryzował proces pozanadnerczowej syntezy aldosteronu, receptory mineralokortykoidowe oraz efekty działania aldosteronu w układzie sercowo-naczyniowym. Ostatnie podrozdziały tej części pracy Autor poświęcił znaczeniu aldosteronu, receptora MR i jego antagonistów w patologii i powikłaniach naczyniowych cukrzycy. Zagadnienia omówione na 25 stronach Wstępu zostały dodatkowo uzupełnione 4 rycinami. Przedstawione we Wstępie pracy zagadnienia świadczą o bardzo dobrym przygotowaniu Doktoranta do podjęcia badań, będących podstawą pracy doktorskiej, a także stanowią wprowadzenie do postawionego celu badań.

Przedstawiony przez mgr farm. Patrycjusza Kołodziejczyka cykl badań stanowi starannie zaplanowany i dobrze przemyślany panel eksperymentalny umożliwiający analizę złożonej hipotezy badawczej. Realizując postawiony cel pracy, Doktorant prowadził badania z wykorzystaniem modelu *in vivo* (62 szczury normotensyjne, samce szczepu Wistar) oraz *in vitro* (na hodowlach ludzkich komórek śródbłonna żyły pępowinowej – HUVEC). Eksperymenty *in vivo* zostały przeprowadzone w Zakładzie Biofarmacji Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku, analizy biochemiczne w pobranych od zwierząt próbkach zostały poddane ocenie w Zakładzie Analizy i Bioanalizy Leków Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku. Pomiar stężenia aldosteronu w surowicy wykonano w Zakładzie Medycyny Nuklearnej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku. W przypadku badań *in vitro*, analizy zostały wykonane w Zakładzie Biochemii Medycznej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi. Na wszystkie procedury dotyczące zwierząt i ich opieki uzyskano zgodę Lokalnej Komisji Etycznej do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach w Białymstoku.

Szczegółowy opis zastosowanych metod badawczych został zamieszczony w rozdziale Materiały i metody. Na uwagę zasługuje fakt, iż w badaniach zastosowano dodatkowo antagonistę receptora MR – eplerenon, leku powszechnie stosowanego w terapii hiperaldosteronizmu, nadciśnienia tętniczego krwi czy niewydolności serca. Przedstawione metody są co do zasady aktualne i adekwatne do rozwiązywanych problemów naukowych i nie budzą żadnych wątpliwości. Pojawiło się jednak zagadnienie, które w mojej opinii wymaga wyjaśnienia lub przedyskutowania:

i/ co stanowiło kryterium wyboru czasu inkubacji komórek HUVEC z aldosteronem przez okres 2 godzin. Czy w dostępnej literaturze stosowane były inne czasy inkubacji?

Sformułowanie powyższego pytania wynika jedynie z przywileju recenzenta, z którego skorzystałem i w żadnym wypadku nie ma charakteru uwag krytycznych. Powyższe zagadnienie może natomiast stanowić wskazówki w kierunku doskonalenia warsztatu badawczego oraz interesujący przedmiot dyskusji na polu naukowo-akademickim.

Uzyskane wyniki badań zostały zredagowane na 17 stronach pracy w rozdziale „Wyniki” oraz udokumentowane szczegółowo w 6 tabelach zbiorczych i 7 rycinach. W części poświęconej dyskusji, Autor dokonuje zasadniczego omówienia wyników jak i również wysuwa po każdym cyklu badań wnioski częściowe. Rozdział ten świadczy o bardzo dobrej znajomości zagadnienia oraz dobrym przygotowaniu do realizacji badań. Na uwagę zasługuje fakt, iż Doktorant dokonuje konfrontacji dla uzyskanych wyników pracy własnej z licznymi wynikami badań prac innych autorów.

Przeprowadzone badania pozwoliły na sformułowanie uzasadnionych wniosków, korespondujących z założonym celem pracy i wnoszących nowe istotne informacje do aktualnego stanu wiedzy. W mojej opinii najistotniejszymi efektami prowadzonych badań było wykazanie iż:

i/ w stanach patologicznych, którym towarzyszą zmiany w stężeniu aldosteronu we krwi występują zmiany w ekspresji receptorów MR w układzie sercowo-naczyniowym,

ii/ wzrost stężenia aldosteronu we krwi prowadzi do zjawiska *down-regulation* i spadku ekspresji receptorów MR w sercu szczura, bez istotnych zmian w aortalii,

iii/ wzrost stężenia aldosteronu we krwi i spadek ekspresji receptorów MR w układzie sercowo-naczyniowym jest szczególnie nasilony w sercu szczurów z cukrzycą,

iv/ Aldosteron poprzez aktywację receptorów MR zlokalizowanych w sercu i naczyniach krwionośnych może inicjować zmiany o podłożu prooksydacyjnym, prowadzące w konsekwencji do rozwoju chorób sercowo-naczyniowych,

v/ hipoteza dotycząca powiązania zmian ekspresji receptorów MR ze zmianami o podłożu profibrotycznym w sercu i naczyniach krwionośnych wymaga dalszych badań.

W tym miejscu, z uwagi na w pełni uzasadnione osiągnięcia naukowe Doktoranta oraz aplikacyjny charakter przedstawionych wyników badań, pozwolę sobie zadać pytanie o wskazanie możliwych kierunków dalszych badań w temacie powiązania zmian ekspresji receptorów MR ze zmianami o podłożu profibrotycznym w sercu i naczyniach krwionośnych.

Cytowane przez Doktoranta 178 pozycje piśmiennictwa naukowego odzwierciedla rzetelnie stan wiedzy w obrębie omawianego tematu. Warto podkreślić, iż 36/178 pozycji, co stanowi około 20% wszystkich danych literaturowych - to doniesienia z ostatnich 10 lat, a spośród nich 11/36 pozycji (około 30%) to prace opublikowane w ciągu ostatnich 5 lat, co wskazuje na dużą aktualność podjętego do oceny przez Doktoranta problemu naukowo-medyczno-społecznego. Rozprawa doktorska została zakończona Streszczeniem w języku polskim i angielskim.

Uzyskane przez Doktoranta wyniki są oryginalne i zaprezentowane w rzetelny sposób. Autor posługuje się fachowym słownictwem, co świadczy o dobrej orientacji w badanej dziedzinie. Treść pracy napisana jest starannie, zwięźle i utrzymana jest w logicznej sekwencji.

Z dużą satysfakcją pragnę podkreślić wartości poznawcze przedstawionych do oceny badań naukowych i ich znaczenie dla zrozumienia mechanizmów i możliwości leczenia chorób cywilizacyjnych jakimi są choroby układu sercowo-naczyniowego. Potwierdzeniem wysokiej wartości merytorycznej przedstawionej do recenzji dysertacji jest opublikowanie części wyników badań, w formie oryginalnych prac - w czasopismach posiadających znaczący współczynnik oddziaływania Impact Factor (*Experimental Biology and Medicine*, 2016 Impact Factor = 2,688; *Current Drug Targets*, 2018 Impact Factor = 2,642; *Cells*, 2021 Impact Factor = 6,600). Należy także podkreślić, iż w jednej publikacji Doktorant jest pierwszym Autorem. Pan mgr Patrycjusz Kołodziejczyk jest w trakcie przygotowywania czwartej publikacji naukowej, w której jest pierwszym autorem. Na uwagę zasługuje również fakt, iż wyniki przedłożonej do recenzji dysertacji zostały zaprezentowane na międzynarodowych konferencjach naukowych (*Frontiers in Cardio Vascular Biology* - Włochy, *International Aldosterone Conference* – Stany Zjednoczone oraz *International Congress of the Polish Physiological Society* – Polska).

Reasumując, przedłożona do oceny rozprawa doktorska Pana mgr Patrycjusza Kołodziejczyka włącza się w niezwykle istotny zarówno z punktu widzenia naukowego, jak i medycznego, nurt badań poświęconych poszukiwaniu potencjalnych nowych form terapeutycznych chorób cywilizacyjnych. Ponadto uważam, że przedłożona przez Doktoranta rozprawa, z uwagi na zaprezentowany poziom naukowy i wartości poznawcze oraz oparcie wysuniętych wniosków na obszernym materiale eksperymentalnym w pełni odpowiada wymogom ustawowym stawianym rozprawom doktorskim.

Potwierdzeniem wysokiej wartości merytorycznej przedstawionej do recenzji dysertacji jest opublikowanie wyników badań w formie oryginalnych prac, w czasopismach posiadających znaczący współczynnik oddziaływania Impact Factor.

Jednocześnie, zważywszy na nowe elementy poznawcze zawarte w ocenianej rozprawie, zastosowanie złożonego panelu eksperymentalnego, a także bardzo ważne znaczenie praktyczne przedstawionych badań, proponuję wyróżnienie pracy.

Podsumowując, w nawiązaniu do powyższego, wyrażam opinię, że przedstawiona do recenzji praca odpowiada wymogom stawianym rozprawom na stopień naukowy doktora, co w konsekwencji upoważnia mnie do wystąpienia z wnioskiem do Kolegium Nauk Farmaceutycznych Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku, o przyjęcie rozprawy doktorskiej i dopuszczenie Pana mgr farm. Patrycjusza Kołodziejczyka do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

PROFESOR SUM BADAWCZO-DYDAKTYCZNY
Katedry i Zakładu Chemii i Analizy Leków
Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach
Artur Beberok
dr hab. n. farm. Artur Beberok prof. SUM