



Prof. dr hab. n. farm. Ewa Chabielska
Zakład Biofarmacji i Radiofarmacji
Uniwersytet Medyczny w Białymstoku
ul. Mickiewicza 2C
15-222 Białystok
tel. 085 748 56 07
e-mail: ewa.chabielska@umb.edu.pl

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

pt., „Wpływ dowieńcowego podania diphenyliodonium oraz L-argininy w buforze o kwasowym odczynie na wielkość blizny pozawałowej i występowanie zaburzeń rytmu serca u szczurów z niedokrwieniem i reperfuzją mięśnia sercowego.”

wykonanej przez lek. Adriana Barzyca
w Katedrze i Zakładzie Fiziologii Doświadczalnej i Klinicznej
Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego.

Promotor: prof. dr hab. n. med. Agnieszka Cudnoch-Jędrzejewska
Promotor pomocniczy: dr n. med. Małgorzata Wojciechowska

Ocena merytoryczna rozprawy

Przywrócenie krążenia do niedokrwionego obszaru mięśnia sercowego, co nazywane jest reperfuzją tętnic wieńcowych, jest standardem leczenia ostrych zespołów wieńcowych od ok. 30 lat. Konsekwencją nagłego przywrócenia krążenia w niedokrwionej tkance jest uszkodzenie niedokrwienno-reperfuzyjne (IRI). Stan taki może być przyczyną nieodwracalnego uszkodzenia tkanki sercowej, czego efektem są zaburzenia przewodzenia, dysfunkcja mięśnia sercowego i niejednokrotnie śmierć chorego. Mechanizmy biorące udział w przebiegu i nasileniu IRI nie są do końca poznane. Niestety interwencje farmakologiczne, nawet jeśli obiecujące w badaniach podstawowych, w większości badań klinicznych są nieskuteczne. Konieczne jest zatem dalsze poznanie patomechanizmów zmian IRI i możliwości ich farmakologicznej poprawy. Wobec powyższego znaczenie poznawcze oraz aplikacyjne tematu badawczego w pełni uzasadnia podjęcie badań stanowiących zakres rozprawy doktorskiej lek. Adriana Barzyca.

Hipoteza badawcza, sformułowana przez Doktoranta, zakłada, że interwencja farmakologiczna, polegająca na wielotorowej ingerencji w różne szlaki prowadzące do poreperfuzyjnego uszkodzenia serca, będzie skuteczna w zmniejszaniu końcowego obszaru zawału serca oraz ograniczeniu częstości występowania epizodów migotania komór serca.

Doktorant wybrał, jako cel swoich działań, kilka komórkowych mechanizmów biorących udział w reperfuzyjnym uszkodzeniu tkanki mięśniowej. Pierwszy z nich to generacja reaktywnych form tlenu (ROS) i spadek biodostępności tlenu azotu (NO) ze wszystkimi konsekwencjami tego procesu. Kolejny, to przetrwałe otwarcie megakanałów mitochondrialnych (MPTP), które bezpośrednio ingerują w śmierć komórki poprzez wpływ na szlaki apoptozy i nekrozy. Doktorant proponuje także zastosowanie kwaśnego buforu odczynie pH 6,8, w celu utrzymania rosnącego w trakcie reperfuzji pH, co istotnie chroni kardiomiocyty przed

uszkodzeniem i pozwala na uniknięcie/zmniejszenie przykurczu reperfuzyjnego. Hamowanie produkcji ROS zamierza uzyskać stosując diphenyliodonium - inhibitor oksydazy ksantynowej podczas, gdy podanie L-argininy - substratu do produkcji NO, miałooby wspomagać działanie diphenyliodonium oraz redukować zjawisko no-reflow.

Doktorant wytyczył cel główny badań polegający na ocenie zmian ryzyka wystąpienia migotania komór serca oraz rozległości obszaru martwicy serca po dowieńcowym podaniu badanych związków i ich połączeń. Cele szczegółowe obejmowały ocenę, w tym samym układzie eksperymentalnym, czasu do przywrócenia fizjologicznego rytmu serca, zmian ciśnienia rozkurczowego w lewej komorze serca odpowiednio w 15 30 i 45 minucie reperfuzji, liczbę epizodów migotania komór podczas reperfuzji, wielkość obszaru serca objętego martwicą, zawartość białka kaspazy-3 (jako markera apoptozy) w koniuszku serca oraz zawartość białka kinazy 3-fosfatydyloinozytolu p85 (jako markera aktywności kardioprotekcyjnej) w koniuszku serca.

Zakres i dobór metod są adekwatne do zamierzonych celów badawczych. Doktorant zastosował model Langendorffa w układzie *in vitro*, w którym wykorzystał serca zdrowych, dorosłych szczurów, samców szczepu Sprague-Dawley (SPRD/Clzd). Niedokrwienie i następca reperfuzja rozpoczynała się po 10 minutach okresu stabilizacji czynności serca. Przepływ buforu w systemie był wyłączany na czas 15 minut (zawał serca), a kurczliwość serca stopniowo zmniejszała się, aż do całkowitego zatrzymania jego czynności. Po 15 minutach rozpoczynał się okres reperfuzji. W początkowych trzech minutach reperfuzji podawano bufor zawierający badane związki. Po zakończeniu tego okresu wymieniano dostęp do układu, a następnie przez okres kolejnych 42 minut podawano, przez nowy dostęp naczyniowy, jedynie bufor Krebsa-Henseleita.

Zgodnie z hipotezą, Doktorant potwierdził kardioprotekcyjny wpływ buforu o kwasowym odczynie (pH 6.8), L-argininy oraz diphenyliodonium. Wykazał też skuteczność ich połączeń. Zastosowanie diphenyliodonium oraz połączenia buforu o kwasowym odczynie, L-argininy i diphenyliodonium istotnie zmniejszyło deltę ciśnienia rozkurczowego w 15, 30 i 45 minucie reperfuzji, co dowodzi spadku siły przykurczu reperfuzyjnego. Także sama L-arginina oraz jej połączenie z buforem o kwasowym odczynie, zmniejszyły deltę ciśnienia rozkurczowego w 30 i 45 minucie reperfuzji. Doktorant wykazał ponadto, że podanie diphenyliodonium, jednoczesne podanie buforu o kwasowym odczynie z L-argininą i diphenyliodonium, podanie L-argininy i diphenyliodonium oraz podanie buforu o kwasowym odczynie z L-argininą, istotnie zmniejszyło obszar martwicy serca. W badaniach molekularnych stwierdził spadek zawartości białka kaspazy-3 oraz kinazy 3-fosfatydyloinozytydu p85 w koniuszku serca w grupach otrzymujących bufor o kwasowym odczynie oraz łącznie bufor o kwasowym odczynie i L-argininę. Nie stwierdził natomiast różnic w czasie upływającym do przywrócenia fizjologicznego rytmu serca w żadnej z grup w porównaniu do grupy kontrolnej ani różnic tego parametru pomiędzy poszczególnymi grupami.

Badania Doktoranta dowodzą, że w zastosowanym układzie eksperymentalnym, zasadne jest podawanie buforu o kwasowym odczynie (pH 6.8), L-argininy oraz diphenyliodonium, a także ich łączenie w celu hamowania różnych mechanizmów leżących u podstaw uszkodzenia

mięśnia sercowego w trakcie IRI. Przychylam się do opinii Doktoranta, iż dokładne mechanizmy działania wymienionych substancji oraz możliwości ich zastosowania w celu ograniczenia uszkodzenia poreperfuzyjnego, wymagają szczegółowych badań. Pragnę podkreślić fakt, iż Doktorant zwraca uwagę na metodologiczne ograniczenia badań, co dowodzi Jego wiedzy oraz umiejętności spojrzenia na pracę naukową z dystansem i uważnością. Słusznie wymienia ograniczenia związane z wyborem modelu *in vitro*, który odbiega od modelu zawału serca, opartego na podwiązaniu lewej tętnicy zstępującej przedniej, możliwego do wykonania w eksperymencie *in vivo*. Podkreśla też brak wpływu na otrzymane wyniki układu autonomicznego i układów hormonalnych, elementów morfotycznych krwi i stanu zapalnego.

Moje zainteresowanie nadal budzą następujące zagadnienia, pominięte lub niedostatecznie omówione w rozprawie:

1. Proszę o podanie tych mechanizmów działania podanych związków, które mogły być odpowiedzialne za efekty kardioprotekcyjne w zastosowanym modelu (izolowany układ *in vitro* i 45 minutowy czas eksperymentu). Doktorant tłumaczy efekty kardioprotekcyjne L-argininy działaniem NO przez jego wpływ - cytuję: „Tlenek azotu (NO), którego donorem jest L-arginina w sposób plejotropowy przyczynia się do ochrony kardiomiocytów – z jednej strony ogranicza opór naczyń wieńcowych oraz obrzęk tkankowy (o czym wyżej wspomniano), z drugiej strony zmniejsza niekorzystne zjawisko no-reflow poprzez hamowanie agregacji płytek krwi, adhezji leukocytów oraz zahamowanie proliferacji mięśni gładkich [252].” (str. 93).

2. Doktorant, 3-krotnie wspomina w pracy o negatywnym wpływie diphenyliodonium na procesy zachodzące w komórce (str. 38, 42, 45) nie definiuje ich jednak i nie wyjaśnia czy mogą być obecne w stężeniu, które stosował. Uważam, że konieczna jest dokładna charakterystyka tego związku ze wskazaniem korzystnych i niekorzystnych działań diphenyliodonium.

3. Które połączenie badanych związków jest najkorzystniejsze? Czy możemy mówić o zjawisku addycji lub hiperaddycji?

3. Czy obserwowane efekty są zgodne z wcześniejszymi badaniami w tym lub innych modelach niedokrwienia i reperfuzji?

5. Jak jest zdanie Doktoranta dotyczące potencjalnej efektywności działania badanych związków u zwierząt chorych (cukrzyca, nadciśnienie tętnicze)?

Ocena formalna rozprawy

Praca powstała w ramach projektu „TIME 2 MUW doskonałość dydaktyczna szansą rozwoju Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego” współfinansowanego z Europejskiego Funduszu Społecznego w ramach Programu Operacyjnego Wiedza Edukacja Rozwój na lata 2014-2020, numer umowy o dofinansowanie: POWR.03.05.00-00-Z040/18-00.

Praca licząca 127 stron została napisana w postaci monografii o strukturze typowej dla tego typu opracowania. Rozprawę podzielono na 8 rozdziałów. We „Wstępie” liczącym 22 strony i 6 zawierającym rycin, Doktorant merytorycznie i zajmująco pisze o mechanizmach uszkodzenia poreperfuzyjnego i możliwościach ich ograniczania poprzez ingerencję farmakologiczną. Ta część wstępu napisana w oparciu o ok. 190 pozycji literaturowych jest *de facto* interesującą pracą poglądową z historycznym spojrzeniem na badania dotyczące uszkodzenia niedokrwienno-reperfuzyjnego serca. W rozdziale „Założenia i cel pracy” Doktorant przedstawia precyzyjnie

sformułowane, spójne z hipotezami i zaplanowanymi badaniami założenia badawcze w formie celu głównego i 6 celów szczegółowych. Kolejny rozdział „Materiały i metody” liczący 20 stron (16 rycin, 1 tabela), zawiera szczegółowy opis metod i protokołów badań. Najdłuższy rozdział rozprawy „Wyniki” liczy 22 strony. Wyniki opisane są bardzo szczegółowo oraz graficznie przedstawione na 19 rycinach i tabeli. Cennym zabiegiem jest umieszczenie tabeli zbiorczej zawierającej mediany badanych parametrów, choć sugerowałabym, aby w publikacji umieszczono w niej istotności statyczne. Przeprowadzona analiza statystyczna jest adekwatna do rodzaju analizowanych zmiennych. Rozdział „Dyskusja i omówienie wyników” liczy niecałe 4 strony i jest podzielony tematycznie na 3 podrozdziały. Doktorant skrótowo omawia rezultaty badań, wpisując je w kontekst hipotezy badawczej. W kolejnym, wartym pozytywnego podkreślenia, rozdziale „Ograniczenia badania” Doktorant zwraca uwagę na metodologiczne ograniczenia pracy. W rozdziale - „Wnioski” przedstawia 3 wnioski, w mojej ocenie będące ogólnym opisem wyników. Dopiero rozdział „Podsumowanie i perspektywy” zawiera przemyślenia Doktoranta odnośnie uzyskanych rezultatów i dalszych badań. W rozdziale „Piśmiennictwo” - znajduje się 270 pozycji obejmujących lata 1895–2022, co wskazuje, że Doktorant bardzo rzetelnie przeanalizował literaturę tematu i dowodzi gruntownego teoretycznego przygotowania Doktoranta do pracy eksperymentalnej i koncepcyjnej. Rozprawę zamyka uchwała II Lokalnej Komisji Etycznej do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach w Warszawie.

W tekście znajdują się usterki redakcyjne oraz błędy merytoryczne: np. nazwanie L-argininy związkami, z którego uwalniany jest NO (str. 95). Doktorant nazywa użyty model eksperymentalny modelem *ex vivo* („Wnioski” – strona 96). Nie zgadzam się z takim opisem modelu - jest to eksperyment wykonany *in vitro*. Lista skrótów jest niepełna, podczas gdy niektóre skróty są objaśniane w tekście wielokrotnie, także błędnie np.: ROS - Reactive oxygen species jest błędnie rozwijany jako – stres oksydacyjny (str. 23) czy wybuch tlenowy (str. 37) lub wolne rodniki tlenowe (str. 92).

Konkluzja i wniosek końcowy

Rozprawa doktorska lek. Adriana Barzyca pt., „Wpływ dowieńcowego podania diphenyliodonium oraz L-argininy w buforze o kwasowym odczynie na wielkość blizny pozawałowej i występowanie zaburzeń rytmu serca u szczurów z niedokrwieniem i reperfuzją mięśnia sercowego.” spełnia warunki określone w art.187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2018 poz. 1668). Do mocnych stron rozprawy doktorskiej zaliczam: postawienie interesującej hipotezy, dobrze zaprojektowane plany badawcze i wyniki, które stanowią cenny wkład do wiedzy o możliwościach farmakologicznej kardioprotekcji w trakcie reperfuzji mięśnia sercowego. Słabą stroną pracy jest niewystarczająca dyskusja nad wynikami.

Reasumując, zwracam się do Rady Dyscypliny Nauk Medycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego w Warszawie z wnioskiem o dopuszczenie lek. Adriana Barzyca do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Prof. dr hab. Ewa Chabielska

07 września 2023 roku