



Akceptuje
[Signature]

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 Fizjologii 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 tlenku azotu (NO) ze wszystkimi konsekwencjami tego procesu. Kolejny, to przetrwałe otwarcie megakanalów mitochondrialnych (MPTP), które bezpośrednio ingerują w śmierć komórki poprzez wpływ na szlaki apaptozy 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, miałyby 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 następcza 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