dr hab. Wanda Pilch, prof. AWF

Zakład Chemii i Biochemii

Wydział Rehabilitacji Ruchowej

AWF im. B. Czecha w Krakowie

Kraków, dn.10.05. 2022r.

Recenzja pracy doktorskiej mgr Danuty Kowalczyk-Pachel

pt. „Wpływ kokainy na metabolizm endogenny związków siarki u szczurów"

Używanie substancji psychoaktywnych jest problem globalnym o znacznym nasileniu, generującym ogromne koszty ekonomiczne i społeczne. Osoby uzależnione rozwijają szereg zmian patofizjologicznych, i w związku z tym, trafiają do lekarzy różnych specjalności. Zmiany te mają często podłoże dotyczące najprostszych, biologicznych mechanizmów, dlatego ważne jest poszerzanie wiedzy dotyczącej wpływu substancji psychoaktywnych na podstawowe procesy fizjologiczne.

Kokaina jest substancją psychoaktywną mogącą powodować poważne konsekwencje zdrowotne. Jest podstawowym lekiem modelowym w badaniach farmakologicznych i toksykologicznych. Jednym z ważnych patomechanizmów stanowiących konsekwencję stosowania kokainy jest nasilony stres oksydacyjny. Zaburzenie równowagi prooksydacyjno-antyoksydacyjnej prowadzi do uszkodzenia wielu tkanek. Biorąc pod uwagę znaczenie problemu oraz fakt ograniczonej liczby publikacji poświęconych ocenie wpływu kokainy na wskaźniki stresu oksydacyjnego i metabolitów związków tiolowych tematyka podjęta przez mgr Danutę Kowalczyk-Pachel wydaje się szczególnie interesująca.

Struktura rozprawy doktorskiej

Praca doktorska, którą otrzymałam do recenzji, poprzedzona jest następującymi rozdziałami: spis treści, wykaz publikacji wchodzących w skład cyklu rozprawy doktorskiej, wykaz skrótów. Sama rozprawa obejmuje: wstęp, cel pracy, materiał i metody badań, wyniki, dyskusję, wnioski oraz streszczenia w języku polskim i angielskim, piśmiennictwo

i załączniki (w tym publikacje stanowiące cykl rozprawy doktorskiej oraz oświadczenia współautorów odnośnie wkładu w powstanie publikacji).

Ocena rozprawy doktorskiej

Rozprawę doktorską stanowi cykl trzech prac opatrzonych wspólnym tytułem „Wpływ kokainy na metabolizm endogenny związków siarki u szczurów", który całkowicie odpowiada tematyce wymienionych poniżej publikacji:

1. Kowalczyk-Pachel . D, Chwatko, Iciek M, Czyżyk J, Filip M, Włodek L, Lorenc-Koci E.: *The effects of cocaine on different redox forms of cysteine and homocysteine, and on labile, reduced sulfur in the rat plasma following active versus passive drug injections.* 2013, 24(3):377-92. doi: 10.1007/s12640-013-9403-6. **IF=3,151; MNiSW=25**

2. Kowalczyk-Pachel D, Iciek M, Wydra K, Nowak E, Górny M, Filip M, Włodek L, Lorenc-Koci E.: *Cysteine Metabolism and Oxidative Processes in the Rat Liver and Kidney after Acute and Repeated Cocaine Treatment.* PLoS One. 2016 25;11(1):e0147238. doi: 10.1371/journal.pone.0147238. **IF=2,806; MNiSW=35**

3. Kowalczyk-Pachel D, Iciek M, Bilska-Wilkosz A, Górny M, Jastrzębska J, Kamińska K, Dudzik P, Filip M, Lorenc-Koci E.: *Evaluation of Cysteine Metabolism in the Rat Liver and Kidney Following Intravenous Cocaine Administration and Abstinence.* Antioxidants (Basel). 2021 Jan 8;10(1):74. doi: 10.3390/antiox10010074. **IF=6,312; MNiSW=100**

Wszystkie przedstawione przez Autorkę publikacje zostały opublikowane w czasopismach z listy filadelfijskiej, a ich łączny impact factor jest wysoki i wynosi **12.269** (160 punktów MNiSW). Mgr Danuty Kowalczyk-Pachel jest pierwszym autorem we wszystkich publikacjach. Zgodnie z deklaracją Autorki i oświadczeniami złożonymi przez współautorów, jej udział w pracach był wiodący i obejmował między innymi: przygotowanie projektu badań i jego przeprowadzenie, analizy biochemiczne oraz statystyczne, interpretację wyników, udział w przygotowaniu publikacji i odpowiedzi na recenzję oraz opracowanie piśmiennictwa.

Badania, będące tematem wyżej wymienionych prac, przeprowadzono w modelu zwierzęcym na dorosłych samcach szczurów szczepu Wistar z zachowaniem wszelkich standardów bioetycznych. Zastosowano różne modele podania zwierzętom kokainy. Lek podawano dootrzewnowo dla zobrazowania efektu ostrego i chronicznego, zastosowano też model dożylnego samopodawania w celu obserwacji efektów podtrzymania nałogu oraz porównania z odstawieniem narkotyku. W modelu samopodawania narkotyku zastosowano także procedurę sprzężenia polegającą na dożylnym podawaniu zwierzętom w niezależnych grupach doświadczalnych tej samej dawki kokainy, którą pobierały szczury z grupy samopodawania. Taka procedura pozwoliła na oddzielenie efektów związanych z aktywnym pobieraniem kokainy i uzależnieniem zwierząt od narkotyku, od efektów czysto farmakologicznych pobrania tych samych dawek kokainy. Po przeprowadzeniu eksperymentu zwierzęta dekapitowano, pobierano krew, izolowano nerki i wątrobę z zachowaniem właściwych procedur. W uzyskanym materiale tkankowym, po homogenizacji, oznaczano stężenie całkowitych i wolnych tioli (cysteina - Cys i homocysteina - Hcy), w uzyskanym osoczu: poziom siarki sulfanowej metodą HPLC (publikacja 1). Oznaczenie grup sulfhydrylowych (-SH) wykonano natomiast metodą Ellmana (publikacja 2 i 3). Wykonano również oznaczenia stężenia siarki sulfanowej, siarki sulfanowej związanej, siarkowodoru, siarczanów z zastosowaniem aktualnych metod biochemicznych. Oznaczono aktywności enzymów w tym: cystationazy (CSE), siarkotransferazy 3- merkaptopirogronianowej (MST), rodanazy (TST), transferazy glutationowej (GST) oraz γ-glutamylotranspeptydazy (γ-GT). Ponadto w osoczu oznaczono stężenie produktów peroksydacji lipidów i poziom reaktywnych form tlenu (ROS). Analizę ekspresji siarkotransferaz wykonano metodą Western blot.

Celem badań stanowiących podstawę pierwszej publikacji była ocena wywołanych kokainą zmian stężeń różnych form red-oks Cys i Hcy oraz produktów beztlenowego i tlenowego metabolizmu Cys w osoczu pozyskanym od szczurów. Stężenia związków wybranych jako markery stresu tiolowego mierzono po jednorazowej i wielokrotnej podaży dootrzewnowej kokainy a także podczas 10-dniowego treningu wygaszania nałogu. Podanie jednorazowe zwiększyło całkowitą ilość Hcy związanej z białkami, zmniejszyło LS, bez wpływu na stężenia Cys w osoczu. Wielokrotne zastosowanie kokainy znacząco zwiększyło stężenie wolnej frakcji Hcy i obniżyło stężenia Cys. Samopodawanie kokainy zwiększyło stężenie Hcy, zmniejszyło LS i nie wpłynęło na stężenia Cys. Podstawowe obserwacje dokonane w niniejszej pracy wskazują na odmienne działanie kokainy na wybrane parametry

stresu tiolowego w zależności od drogi podania leku. Ponieważ w niniejszej pracy, droga podania była łączona ze stanem uzależnienia od tego środka farmakologicznego, można wyciągnąć wnioski iż, opisane różnice wskazują, że stan uzależnienia jest ważnym czynnikiem modyfikującym efekt działania kokainy na stres tiolowy.

W kolejnym badaniu Doktorantka oceniała wpływ jednorazowego i powtarzanego (5 dni) dootrzewnowego podawania kokainy na metabolizm Cys oraz procesy oksydacyjne przebiegające w wątrobie i nerkach szczura. Pulę siarki sulfanowej i siarkowodór (H_2S) wskazano jako markery beztlenowego metabolizmu Cys, natomiast ilość siarczanów stanowiła miarę jej metabolizmu tlenowego. Oznaczono całkowity, niebiałkowy i białkowy poziom grup SH, aktywność wybranych enzymów biorących udział w tworzeniu H_2S oraz metabolizmu glutationu. Oznaczono stężenia ROS i dialdehydu malonowego (MDA). Zaobserwowano obniżenie stężenia niebiałkowych grup SH, ROS i aktywności GST po jednorazowym podaniu kokainy. W homonogenach nerek zwierząt, po jednorazowym podaniu kokainy, istotnie zwiększyły się stężenia siarki sulfanowej (przy jednoczasowym obniżeniu ilości siarki związanej), natomiast poziomy H_2S, siarczanu i niebiałkowych grup SH pozostały niezmienione. Stężenie ROS i aktywności: GST i γ-GT uległy zmniejszeniu. W wątrobie i nerkach, jednorazowa ekspozycja spowodowała wzrost aktywności CSE i MST. Wielokrotne podawanie kokainy zwiększyło stężenie siarki sulfanowej, obniżyło stężenie H_2S, zwiększając jednocześnie zawartość siarczanów zarówno w wątrobie, jak i w nerkach. Obserwowano znaczny spadek ROS. W nerkach, pomimo niezmienionej zawartości ROS, obserwowano wzrost stężenia MDA. Zmniejszyła się aktywność MST i zwiększyła aktywność γ-GT w obu narządach. Wykazano, że kokaina podawana w stosunkowo niskich dawkach przesuwa metabolizm Cys w kierunku tworzenia związków sulfanu, a te posiadają właściwości antyoksydacyjne oraz są źródłem H_2S.

Ostatnia w cyklu praca miała na celu ocenę wpływu kokainy na stężenie tioli i seaktywnych form siarki (RSS) w wątrobie i nerkach szczurów i zwierząt kontrolnych wcześniej uzależnionych od kokainy. Podobnie jak we wcześniejszych pracach, oznaczono poziomy związków siarkowych (tioli oraz RSS) i aktywności wybranych enzymów biorących udział w tworzeniu RSS i metabolizmie glutationu. Zaobserwowano krzyżowy efekt w wątrobie i nerkach: w wątrobie stężenie RSS zmniejszyło się a w nerkach uległo zwiększeniu. Zmiany te utrzymywały się w tych tkankach podczas abstynencji lekowej. Kokaina zmieniała poziom siarczanów tylko w wątrobie. W nerkach przesunęła metabolizm

cysteiny w kierunku szlaku beztlenowego. Badania molekularne pokazały, że podanie kokainy wpływa na ekspresję enzymów związanych z metabolizmem siarki w wątrobie.

Do oryginalnych i ważnych osiągnięć mgr. Danuty Kowalczyk-Pachel należy niewątpliwie:

1. Wykazanie, że istnieje odmienny przebieg zmian stężenia Cys i Hcy w osoczu oraz beztlenowych przemian Cys u zwierząt w zależności od sposobu podania narkotyku, co sugeruje, że uzależnienie lekowe ma wpływ na formy redoksowe związków siarki.
2. Wskazanie, że kokaina wywołuje inny wpływ na tlenowy i beztlenowy metabolizm cysteiny, homeostazę tiolową i procesy oksydacyjne w wątrobie i nerkach badanych zwierząt po podaniu jednorazowym i wielokrotnym oraz w zależności drogi podania.
3. Wykazanie, że kokaina wpływa na regulację enzymów biorących udział w syntezie i transporcie RSS, zarówno na poziomie ekspresji jak i aktywności tych białek.

Uwagi końcowe

Stwierdzam, że mgr Danuta Kowalczyk-Pachel posiada szeroką wiedzę w zakresie tematyki, którą podjęła, a przedłożona mi do oceny rozprawa doktorska prezentuje bardzo wysoki poziom naukowy i wnosi oryginalną wiedzę do dyscypliny nauk medycznych. Prace stanowiące cykl publikacji pt. „Wpływ kokainy na metabolizm endogenny związków siarki u szczurów" to zbiór logicznie i wzajemnie się dopełniających danych o dużej wartości naukowej, poznawczej i aplikacyjnej. Wszystkie prace wcześniej były pozytywnie ocenione przez niezależnych recenzentów i finalnie zostały opublikowane w prestiżowych czasopismach naukowych.

Z uwagi na powyższe, zwracam się do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauki farmaceutyczne UJ o dopuszczenie Pani mgr Danuty Kowalczyk–Pachel do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie z pełnym przekonaniem wnioskuję o wyróżnienie niniejszej rozprawy doktorskiej, gdyż prezentuje ona wysoki poziom naukowy, wyróżnia się oryginalnością zastosowanych metod badawczych a przede wszystkim opiera jest na artykułach opublikowanych w renomowanych czasopismach naukowych.