Zakład Patofizjologii
UNIWERSYTET MEDYCZNY W LUBLINIE
ul. Jaczewskiego 8b, 20-090 Lublin
tel. +48 81 448 65 00

prof. dr hab. Jerzy Bełtowski
Zakład Patofizjologii
Uniwersytet Medyczny w Lublinie
ul. Jaczewskiego 8b
20-090 Lublin
tel. 81 4486500
e-mail: jerzy.beltowski@umlub.pl

Lublin, 29.05.2023

Recenzja pracy doktorskiej Pani Dominiki Szlęzak
pt. „Badanie wpływu nadciśnienia tętniczego i wieku na powstawanie siarkowodoru i tlenku azotu w wybranych tkankach szczura"

Celem przedstawionej pracy doktorskiej była ocena wpływu wieku oraz nadciśnienia tętniczego na powstawanie dwóch endogennych gazowych mediatorów, siarkowodoru i tlenku azotu, w wybranych tkankach szczura, ekspresję wybranych enzymów biorących udział w syntezie i metabolizmie tych mediatorów, wybranych drobnocząsteczkowych związków siarki oraz endogennych inhibitorów syntazy NO, asymetrycznej i symetrycznej dimetyloargininy. Badania wykonano w Katedrze Biochemii Lekarskiej Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie pod kierunkiem prof. dr hab. Marii Wróbel we współpracy z Zakładem Fizjologii i Patofizjologii Eksperymentalnej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego pod kierunkiem prof. dr hab. Marcina Ufnala jako promotora pomocniczego.

Pracę doktorską stanowi cykl 3 prac oryginalnych opublikowanych w czasopismach z listy Journal Citation Reports (JCR): Cells, Biochimie i Amino Acids, odpowiednio w 2021, 2022 i 2023 roku. Całkowity Impact Factor trzech publikacji wynosi 15,827, a punktacja MNiSW 340. We wszystkich 3 pracach doktorantka jest pierwszym autorem. Wszyscy współautorzy złożyli oświadczenia określające indywidualny wkład każdego z nich w powstanie publikacji oraz wskazujące, co jest samodzielną i możliwą do wyodrębnienia częścią pracy będącą indywidualnym wkładem Doktorantki. W oświadczeniach współautorów wszystkich 3 publikacji stwierdzono, że udział Doktorantki polegał na zaplanowaniu i wykonaniu części doświadczalnej

(ze wskazanie konkretnych oznaczeń), wykonaniu analizy statystycznej i interpretacji wyników badań, przygotowaniu manuskryptu oraz współudziale w analizie recenzji manuskryptu, przygotowaniu odpowiedzi na recenzję i przygotowaniu poprawionej wersji pracy. Na podstawie analizy oświadczeń stwierdzam, że przedstawiona praca stanowi samodzielny wkład Doktorantki.

Nadciśnienie tętnicze jest chorobą cywilizacyjną, coraz częściej występującą nie tylko w krajach rozwiniętych ale również w krajach rozwijających się. Choroba ta często przez długi czas przebiega bezobjawowo i nadal u wielu osób jest zbyt późno rozpoznawane. Jednocześnie nadciśnienie stanowi jeden z najważniejszych czynników ryzyka chorób układu sercowo-naczyniowego, w tym miażdżycy, przerostu mięśnia sercowego, choroby niedokrwiennej serca, zwałów serca i niewydolności tego narządu oraz udarów mózgu, pośrednio przyczyniając się do dużej liczby zgonów oraz generując duże koszty zdrowotne i ekonomiczne. Równie istotnym i w niedostatecznym stopniu poznanym zagadnieniem jest proces starzenia. Wraz z wiekiem dochodzi do pogorszenia funkcji śródbłonka naczyniowego, co powoduje zaburzenia regulacji napięcia naczyń i częstsze występowanie nadciśnienia tętniczego u osób starszych. Etiopatogenezea nadciśnienia tętniczego pierwotnego jest złożona i wciąż nie w pełni poznana. Większość badań doświadczalnych na temat nadciśnienia tętniczego wykonywanych jest u zwierząt młodych i tym samym nie uwzględnia zależności między procesem starzenia a nadciśnieniem.

Tlenek azotu i siarkowodór są endogennymi mediatorami gazowymi syntetyzowanymi enzymatycznie odpowiednio z L-argininy i L-cysteiny. Oba mediatory odgrywają istotną rolę w regulacji napięcia naczyń krwionośnych oraz transportu sodu w kanalikach nerkowych – procesów kluczowych w długoterminowej regulacji ciśnienia tętniczego. Jakkolwiek rola tlenku azotu w tym zakresie jest badana już od ok. 40 lat, nie została ona dotychczas w pełni wyjaśniona, m. in. ze względu na jego krótki okres półtrwania i trudności w pomiarze stężenia in vivo. Siarkowodór jest mediatorem badanym znacznie krócej i jego udziałowi w rozwoju nadciśnienia poświęcono znacznie mniej uwagi, ponadto w znacznej części prac na ten temat stosowano nieswoiste metody pomiaru stężenia tego mediatora. Tym bardziej mało badań poświęcono obu tym mediatorom jednocześnie, co ma szczególnie istotne znaczenie ze względu na fakt, że NO i H_2S reagują ze sobą tworząc kilka nowych związków również o istotnym działaniu biologicznym, a także, oba te mediatory wzajemnie wpływają na swoją syntezę i działanie. Coraz częściej w literaturze podkreśla się, że znaczenia NO i H_2S nie należy

rozpatrywać osobno, ale łącznie. Podjęcie badań na ten temat przez Autorkę jest zatem w pełni uzasadnione.

Badania wykonano u szczurów z prawidłowym ciśnieniem tętniczym (Wistar-Kyoto) oraz u zwierząt z samoistnym nadciśnieniem tętniczym (SHR) w wieku 16 oraz 60 tygodni. Zwierzęta przebywały w standardowych warunkach laboratoryjnych. U zwierząt wykonywano dwudobową zbiórkę moczu w klatkach metabolicznych w celu uzyskania moczu do analizy i oceny bilansu wodno-elektrolitowego. Następnie zwierzęta wprowadzano w stan znieczulenia ogólnego za pomocą uretanu i rejestrowano parametry hemodynamiczne metodą bezpośrednią. Po zakończeniu badań hemodynamicznych pobierano krew oraz narządy. Osocze, tkanki i mocz przechowywano do momentu wykonania oznaczeń w temperaturze -80°C.

Oznaczenia wykonano w tkankach (wątroba, serce, nerki) moczu oraz osoczu. Badano powstawanie H_2S, ekspresję genów kodujących enzymy syntetyzujące i metabolizujące H_2S (CBS, CTH, MPST i TST), aktywność tych enzymów, poziom siarki sulfanowej, stężenie zredukowanego i utlenionego glutationu, cysteiny, cystyny i cystationiny, parametry związane z syntezą NO w tkankach i moczu, w tym metabolity NO, ekspresję śródbłonkowej syntazy tlenku azotu (eNOS) na poziomie RNA, stężenia argininy, ornityny i cytruliny, ADMA i SDMA. Wykonano tez badania histopatologiczne wątroby. Na wykonanie badań uzyskano zgodę I Lokalnej Komisji Etycznej ds. Doświadczeń na zwierzętach w Warszawie.

Syntezę H_2S badano w homogenatach tkankowych w obecności L-cysteiny jako substratu oraz fosforanu pirydoksalu jako kofaktora CBS i CTH, a powstający H_2S oznaczano metodą spektrofotometryczną. Ekspresję enzymów na poziomie mRNA oznaczano metodą RT-PCR. Aktywność CBS oznaczano na podstawie ilości produktu, cystationiny, oznaczanej metodą RP-HPLC z jednoczesnym zastosowaniem inhibitora CTH. Aktywność CTH oznaczano na podstawie stężenia produktu, alfa-ketomaślanu, powstającego z cystationiny. Aktywność MPST oznaczano na podstawie przekształcania 3-merkaptopirogronianiu do pirogronianu. Aktywność rodanazy (TST) oznaczano na podstawie ilości jonów tiocyjanianowych powstających przy udziale enzymu. Poziom siarki sulfanowej oznaczano w oparciu o metodę zimnej cyjanolizy. Stężenia glutationu, cysteiny, cystyny i cystationiny oznaczano metodami opartymi na chromatografii cieczowej. Ilość tlenku azotu oceniano na podstawie stężenia jego metabolitów, azotynów i azotanów. Stężenia SDMA i ADMA oznaczano metodą ultrawysokosprawnej chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrem mas. Szczegóły tych metod opisano w

pracach oryginalnych wchodzących w skład pracy doktorskiej lub/i w cytowanych w nich wcześniejszych pracach, w których metody te zostały po raz pierwszy opublikowane.

Wykonane badania wykazały, że zdolność do tworzenia H_2S w wątrobie jest większa u szczurów z nadciśnieniem niż u szczurów zdrowych niezależnie od wieku. Zarówno u zwierząt normotensyjnych jak i u szczurów z nadciśnieniem zdolność do syntezy H_2S w wątrobie jest większa w wieku 60 niż 16 tygodni. Zdolność do tworzenia H_2S w sercach i nerkach spadała wraz z wiekiem i była niższa w obu grupach wiekowych u szczurów z nadciśnieniem niż u zwierząt normotensyjnych. Podobne zmiany występowały w odniesieniu do stężenia NO. Wykazano też spadek wydalania ADMA i SDMA u szczurów 60 tygodniowych w stosunku do zwierząt młodych oraz mniejsze wydalanie tych metabolitów u szczurów z nadciśnieniem niż u szczurów normotensyjnych. Na podstawie uzyskanych wyników sformułowano 5 spójnych i logicznie wynikających z nich wniosków.

Polskojęzyczne omówienie pracy ma układ typowy dla prac doktorskich. Obejmuje spis treści, wykaz stosowanych skrótów, wykaz prac wchodzących w skład rozprawy, informacje na temat finansowania badań, streszczenie w języku polskim i angielskim, wstęp, cel pracy, materiały, metody, kopie prac oryginalnych, omówienie wyników, wnioski, spis literatury oraz oświadczenia współautorów.

We wstępie przedstawiono podstawowe informacje na temat nadciśnienia tętniczego, syntezy i działania NO i H_2S. W kolejnych częściach w syntetyczny sposób przedstawiono opis metod badawczych, najważniejsze wyniki i wnioski.

Podjęcie przez autorkę badań na ten temat jest w pełni uzasadnione z przyczyn przedstawionych w początkowej części recenzji. Wysoko oceniam wybrany model doświadczalny. Szczury z samoistnym nadciśnieniem (SHR) są powszechnie wykorzystywanym modelem nadciśnienia samoistnego. Szczególną wartość ma wykonanie badań zarówno u zwierząt młodych jak i starszych, co pozwala na ocenę interakcji wieku i nadciśnienia. Również cenne jest jednoczesne badanie obu mediatorów; w większości prac na ten temat badacze skupiają się tylko na jednym z nich. Warto podkreślić też wykonanie badań w kilku narządach, podczas gdy większość autorów skupia się tylko na jednym. Co ważne, oznaczano obie formy glutationu, zredukowaną i utlenioną, co pozwala na rozróżnienie efektów stresu oksydacyjnego od zmian w biosyntezie glutationu. W wielu pracach oznaczane jest tylko stężenie całkowite lub stężenie formy zredukowanej. Uzyskane wyniki są bardzo interesujące i wskazują na interakcje

wieku i nadciśnienia tętniczego w zakresie regulacji poziomu obu mediatorów w układzie krążenia. Szczególnie interesujące są obserwacje dotyczące zachowania SDMA i ADMA, pozornie sprzeczne z ich wpływem na syntezę NO, a w rzeczywistości mogące świadczyć o zmianach adaptacyjnych poziomu tych metabolitów wywołanych spadkiem poziomu NO. Należy też zaznaczyć, że zmiany stężenia metylowanych pochodnych argininy mogą odzwierciedlać zmiany stopnia metylacji białek histonowych, co jest szczególnie interesujące w kontekście znaczenia mechanizmów epigenetycznych w nadciśnieniu. Dyskusja uzyskanych wyników zawarta we wszystkich 3 pracach oryginalnych jest oparta na aktualnym i bogatym piśmiennictwie i uwzględnia zarówno możliwe mechanizmy obserwowanych zmian jak i ich implikacje dla patogenezy nadciśnienia i jego powikłań. Również interesujące są wyniki dotyczące powstawania H_2S w wątrobie, która jest narządem uważanym za niezwiązany ani z rozwojem nadciśnienia ani z jego powikłaniami. Wnioski, zarówno przedstawione w poszczególnych pracach oryginalnych jak i wnioski zbiorcze zamieszczone w pracy doktorskiej logicznie wynikają z wykonanych badań, świadczą o umiejętności analizy wyników i wskazują na perspektywy dalszych badań. Wszystkie prace oryginalne wchodzące w skład pracy doktorskiej zostały opublikowane w renomowanych czasopismach naukowych.

Należy podkreślić fakt, że zespół Pani prof. Wróbel będącej promotorem pracy doktorskiej od wielu lat zajmuje się biochemią związków siarki, także przed „erą siarkowodoru", kiedy nie był to częsty temat badań. Po odkryciu, że H_2S jest endogennym mediatorem nastąpił lawinowy wysyp prac na ten temat, często podejmowanych przez zespoły nie mające doświadczenia w tym zakresie i traktujące H_2S w sposób bardzo wybiórczy, w oderwaniu od ściśle związanych zagadnień jak metabolizm wielosiarczków, nadsiarczków i innych form siarki sulfanowej. Ze względu na niezwykle skomplikowany metabolizm związków siarki, dużą wartością ocenianej pracy jest traktowanie roli H_2S w tym szerszym kontekście. Należy też podkreślić, że uzyskane wyniki mogą mieć w przyszłości również zastosowanie praktyczne gdyż mogą stać się podstawą do zastosowania donorów H_2S w terapii. Prace nad opracowaniem takich donorów są prowadzone w różnych ośrodkach i jest to kierunek bardzo obiecujący, ponieważ H_2S nie tylko rozszerza naczynia, ale również działa przez inne mechanizmy istotne w rozwoju powikłań nadciśnienia jak modyfikacja zapalenia, hamowanie przerostu mięśnia sercowego, włóknienia, itp.

Z obowiązku recenzenta wskazuje na pewne niedociągnięcia i ograniczenia przedstawionej do oceny pracy. W polskojęzycznym omówieniu pracy znalazły się pewne uproszczenia i nieścisłości. We wstępie jest informacja, że H_2S rozszerza naczynia poprzez aktywację kanałów potasowych wrażliwych na ATP w komórkach mięśniowych. Jakkolwiek jest to najwcześniej opisany mechanizm działania H_2S, nie jest mechanizmem jedynym. Między innymi H_2S aktywuje też kanały potasowe o małym i pośrednim przewodnictwie aktywowane wapniem (SK_{Ca}, IK_{Ca}) w komórkach śródbłonka powodując ich repolaryzację, która następnie rozprzestrzenia się na komórki mięśniowe. H_2S wpływa również na aktywność fosfodiesteraz rozkładających cGMP czy na aktywność kinazy białkowej G w komórkach mięśniowych naczyń. Ze względu na tematykę pracy, warto byłoby szerzej omówić zagadnienie interakcji H_2S i NO. Działanie kardioprotekcyjne H_2S wynika nie tylko, jak wskazała Autorka, z działania na naczynia krwionośne. W szczególności, H_2S ma też działanie kardioprotekcyjne w warunkach niedokrwienia-reperfuzji poprzez bezpośredni wpływu na mięsień sercowy. Bardzo ogólnie scharakteryzowano we wstępie działanie H_2S na nerki. Informacje, że odgrywa on „ważną rolę w utrzymaniu filtracji nerkowej i funkcji kanalików nerkowych" niewiele wnosi dla czytelnika nie zaznajomionego z zagadnieniem. Fakt, że H_2S odgrywa istotną rolę w regulacji gospodarki wodno-elektrolitowej jest wynikiem jego działania na nerki a nie jednym z tych działań. Sformułowanie o wpływie na tworzenie moczu jest zbyt ogólne; tworzenie moczu jest wypadkową działania kłębuszków nerkowych (filtracji) i transportu w kanalikach, a nie odrębnym procesem. Wstęp (strona 16 pracy doktorskiej) zawiera informację, że NO indukuje zależne od śródbłonka rozszerzenie naczyń krwionośnych. Jest to błędne sformułowanie, NO pobudza syntezę cGMP w komórkach mięśniowych i jego działanie jest niezależne od śródbłonka. NO jest mediatorem pośredniczącym w działaniu mediatorów rozszerzających naczynia działających zależnie od śródbłonka jak acetylocholina czy substancja P, natomiast działanie samego NO czy jego donorów nie wymaga już obecności śródbłonka.

Mam również pewne uwagi dotyczące samych badań. Ekspresję enzymów oznaczano jedynie na poziomie mRNA. Dodatkowe oznaczanie tej ekspresji na poziomie białka pozwoliłoby określić, w jakim stopniu obserwowane zmiany aktywności wynikają ze zmian stężenia enzymu a w jakim ze zmiany aktywności właściwej. Zmiany ekspresji na poziomie mRNA nie zawsze pociągają za sobą równoległe zmiany ilości białka. W pracy mowa jest o „stężeniu NO" w tkankach, co jest nadinterpretacją wyników. W rzeczywistości nie oznaczano

samego tlenku azotu, ale poziom jego metabolitów, azotynów i azotanów, które mogą też pochodzić z innych źródeł np. z pokarmu. Ponadto azotyny i azotany są wydalane przez nerki, a upośledzona ich funkcja może prowadzić do wzrostu stężenia w osoczu i tkankach pomimo prawidłowej lub nawet obniżonej syntezy NO. Ma to istotne znaczenie wobec faktu, że długotrwałe nadciśnienie często prowadzi do zaburzeń funkcji nerek. Nie sprecyzowano w jakiej części serca i nerek wykonywano oznaczenia. W sercu u zwierząt z nadciśnieniem największych zmian można się spodziewać w obrębie mięśnia lewej komory. Z kolei w nerkach występują bardzo duże różnice w metabolizmie H_2S i NO w obrębie kory i rdzenia, co wynika zarówno z różnej ekspresji enzymów syntetyzujących te mediatory jak i stężenia tlenu mającego ogromny wpływ na utlenianie ich obu. Podczas gdy stężenie tlenu w korze nerek jest znacznie większe niż w większości tkanek w związku z bardzo dużym przepływem krwi, ograniczona perfuzja rdzenia nerki w połączeniu ze dużym zużyciem tlenu związanym z aktywnym transportem elektrolitów w ramieniu wstępującym pętki Henlego sprawiają, że ta część nerki funkcjonuj e co najmniej na pograniczu hipoksji, a według niektórych autorów po prostu w warunkach fizjologicznej hipoksji. Istotne byłoby zatem wykonanie oznaczeń w obu tych częściach nerki. Badania wykonano tylko u samców. Ponieważ istnieją istotne różnice w etiopatogenezie nadciśnienia zależne od płci, istotne byłoby wykonanie podobnych badań również u samic. Badania histologiczne wykonano tylko w wątrobie. Ciekawe byłyby wyniki analogicznych badań serca i nerek, które odpowiedziałyby na pytanie o występowanie i zaawansowanie zmian będących skutkiem nadciśnienia; zmiany takie bardzo prawdopodobne zwłaszcza u szczurów 60-tygodniowych. Drugi ze sformułowanych wniosków ma charakter opisowy i stanowi de facto ogólne podsumowanie wyników, a nie wniosek jako taki. Trzeci z wniosków jest nieco za daleko posunięty. Na podstawie uzyskanych wyników można przypuszczać, że zmiany aktywności enzymów są wynikiem stresu oksydacyjnego, ale nie zostało to wprost udowodnione w pracy. Przedstawione uwagi nie wpływają jednak znaczącą na ogólną bardzo pozytywną ocenę pracy. Jako osoba sama zajmująca się badaniami doświadczalnymi na zwierzętach dobrze zdaję sobie sprawę, że nie da się w takich badaniach uwzględnić wszystkich interesujących aspektów jednocześnie.

Podsumowując, Doktorantka trafnie zidentyfikowała ważny problem badawczy, klarownie go przedstawiła i poprawnie sformułowała cel badawczy. Właściwie dobrała metody badawcze i zaplanowała eksperymenty, które pozwoliły jej scharakteryzować zależność

pomiędzy wiekiem, nadciśnieniem tętniczym a produkcją i metabolizmem NO i H_2S w tkankach. Ponadto wykazała się umiejętnością analizy i interpretacji danych, przygotowania manuskryptów publikacji naukowych do druku oraz przeprowadzenia dyskusji naukowej.

Biorąc pod uwagę wszystkie powyższe fakty stwierdzam, że rozprawa doktorska pani Dominiki Szlęzak pt. „**pt. „Badanie wpływu nadciśnienia tętniczego i wieku na powstawanie siarkowodoru i tlenku azotu w wybranych tkankach szczura**"" przygotowana pod opieką promotorską dr. hab. Marii Wróbel i prof. dr hab. Marcina Ufnala spełnia wszystkie kryteria stawiane rozprawom doktorskim i wnoszę do Rady Dyscypliny Nauk Medycznych Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie o dopuszczenie Autorki do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie, biorąc pod uwagę nowatorską tematykę pracy, oznaczanie wielu parametrów związanych z powstawaniem i metabolizmem zarówno H_2S jak i NO, wartościowe wyniki oraz fakt, że prace oryginalne wchodzące w skład rozprawy zostały opublikowane w czasopismach o wysokim Impact Factor wnoszę o wyróżnienie rozprawy doktorskiej.

Lublin, dn. 29 maja 2023

Jerzy Bełtowski

Prof. dr hab. n. med. Jerzy Bełtowski
lekarz chorób wewnętrznych
Nr Prawa Wyk. Zawodu
8392495