



UNIwersytet Jagielloński
COLLEGIUM MEDICUM
W KRAKOWIE

Wydział Farmaceutyczny

Kraków dn. 2021-05-31

Prof. dr hab. Barbara Filipek
Katedra Farmakodynamik

Ocena

rozprawy doktorskiej mgr Adriana Łukasza Mora pt.: „Wpływ inhibitora hydroksylazy tryptofanu – LP533401 na parakryny układ kinureninowy tkanki kostnej w doświadczalnym modelu przewlekłej choroby nerek”

Przedstawiona do recenzji praca doktorska została wykonana w Zakładzie Farmakodynamiki Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku, pod opieką promotora prof. dr hab. n. med. Dariusza Pawlaka. Temat rozprawy wpisuje się w główny nurt badawczy realizowanego w/w Zakładu grantu pt.: „Hamowanie aktywności hydroksylazy tryptofanu typu I – nowa koncepcja leczenia zaburzeń metabolizmu kostnego w przewlekłej niewydolności nerek”.

Przedłożona do oceny rozprawa doktorska stanowi cykl dwóch monotematycznych publikacji naukowych, które są oryginalnymi pracami, opublikowanymi w 2020 roku w anglojęzycznych czasopismach. W skład cyklu wchodzi następujące publikacje:

1. Mor A., Kałaska B., Pawlak D.: Kynureine Pathway in Chronic Kindey: What’s Old, What’s New, and What’s Next ? International Journal of Tryptophan Research 2020, 13, 1-18; doi:10.1177/1178646920954882. (MNiSW = 100 pkt)
2. Mor A., Pawlak K., Kałasa B., Domaniewski T., Sieklucka B., Ziemińska M., Cylwik B., Pawlak D.: Modulation of the Paracrine Kynurenic System in Bone as a New Regulator of Osteoblastogenesis and Bone Mineral Status in an Animal Model of Chronic Kidney Disease Treated with LP533401. Interational Journal of Molecular Sciences 2020, 21, 5979; doi: 103390/ijms21175979. IF =4,556; MNiSW = 140 pkt.

Łączna wartość tych publikacji według kryteriów MNiSW (zgodnie z rokiem opublikowania) wynosi 240 punktów, a wartość współczynnika IF według listy JCR wynosi 4,556. W wyżej wymienionych pracach Doktorant jest pierwszym autorem i Jego udział w powstawaniu tych prac wynosi od 75% do 80%, co wskazuje na dominujący wkład w tworzeniu i realizacji badań. Doktorant złożył oświadczenie, z którego wynika, że jego wkład w powstawaniu pierwszej publikacji polegał na zebraniu i przeglądzie literatury, analizie i interpretacji danych oraz przygotowaniu manuskryptu artykułu, natomiast w przypadku drugiej publikacji jego wkład polegał na opracowaniu koncepcji i planu badań oraz metod badawczych, prowadzeniu części eksperymentalnej badań, analizie statystycznej wyników i

ich interpretacji oraz przygotowaniu manuskryptu artykułu. Współautorzy poszczególnych prac również złożyli stosowne oświadczenia, w których przedstawili swój wkład w ich powstanie. W tym miejscu należy również wspomnieć, że Doktorat jest współautorem trzech innych prac nie wchodzących w skład niniejszej rozprawy doktorskiej, których wartość IF wynosi 5.365 (180 punktów MNiSW).

Rozprawa doktorska, której podstawą są wyżej wymienione publikacje została zatytułowana „Wpływ inhibitora hydroksylazy tryptofanu – LP533401 na parakrynnny układ kinureninowy tkanki kostnej w doświadczalnym modelu przewlekłej choroby nerek ”, obejmuje wykaz publikacji stanowiących rozprawę doktorską, wykaz stosowanych skrótów, wprowadzenie, cel pracy z uzasadnieniem podjętej tematyki badawczej, realizację celów naukowych, materiały i metody badawcze, podsumowanie wyników badań i dyskusję, wnioski, piśmiennictwo, streszczenie w języku polskim, streszczenie w języku angielskim, kserokopie dwóch publikacji oraz oświadczenie autora rozprawy doktorskiej, oświadczenia współautorów rozprawy doktorskiej, zgodę Lokalnej Komisji Etycznej do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach w Białymstoku, zgodę kierownika jednostki na wykorzystanie materiału badawczego, wykaz dorobku naukowego Doktoranta.

Tytuł rozprawy doktorskiej jest nowatorski z uwagi na stosunkowo niewielką liczbę publikacji w literaturze krajowej i zagranicznej na temat udziału szlaku kinureninowego i jego ewentualnych powiązań ze szlakiem serotoninowym oraz metabolizmem kostnym w przebiegu przewlekłej choroby nerek (PChN), a przede wszystkim wpływu LP533401 - inhibitora hydroksylazy tryptofanu – na parakrynnny układ kinureninowy tkanki kostnej.

Celem badań wchodzących w zakres niniejszej rozprawy było ustalenie czy tkanka kostna posiada własny układ kinureninowy, wykazanie jego ewentualnego wpływu na metabolizm kostny i regulację gospodarki mineralnej w eksperymentalnym modelu przewlekłej choroby nerek oraz sprawdzenie czy hamowanie syntezy obwodowej serotoniny przez zastosowanie preparatu LP533401 - inhibitora obwodowej hydroksylazy tryptofanowej (TPH-1) - może wpływać na aktywność szlaku kinureninowego w tkance kostnej szczurów poddanych nefrektomii oraz określić potencjalne konsekwencje tego wpływu na regulację gospodarki mineralnej i metabolizm kostny.

Do realizacji celu pracy Doktorant przystąpił dobrze przygotowany, w czym niewątpliwie pomogła Mu pierwsza publikacja przeglądowa, w której usystematyzował i przedstawił w sposób przejrzysty dotychczasowy stan wiedzy na temat możliwych szlaków przemiany tryptofanu w organizmie oraz na wiedzy łączącej metabolity szlaku kinureninowego z zaburzeniami ogólnoustrojowymi towarzyszącymi rozwojowi przewlekłej chorobie nerek (PChN). Cytowane wyniki badań wskazują, że zaburzenia w metabolizmie tryptofanu i kumulacja jego toksycznych metabolitów w organizmie wydają się być jednym z najważniejszych czynników leżących u podstaw rozwoju objawów mocznicowych, takich jak zaburzenia neurologiczne, zaburzenia metabolizmu lipidów i dysfunkcji śródbłonna naczyń prowadzące do miażdżycy, nadkrzepliwości, zwapnień naczyń, co wiąże się z częstszym występowaniem incydentów sercowo-naczyniowych. Jednym z poważniejszych powikłań u pacjentów z PChN są zaburzenia metabolizmu kostnego, które mogą prowadzić do samoistnych złamań kości, istotnie pogarszając jakość życia, są powodem kalectwa, a także

zwiększonej chorobowości i śmiertelności. Wyniki wielu badań wskazują, że przemiana tryptofanu na drodze szlaku kinureninowego w przebiegu przewlekłej niewydolności nerek jest silnie zwiększona i metabolity tego szlaku mogą odgrywać ważną rolę w zaburzeniach metabolizmu kostnego. Opisane powyżej dane stały się podstawą do oceny powiązania wybranych produktów degradacji tryptofanu szlakiem kinureninowym (kinureniny i jej bezpośredniego, wysoce reaktywnego biologicznie metabolitu - 3-hydroksykinureniny) z procesami metabolicznymi i biomechaniką kości w doświadczalnej niewydolności nerek. Niewątpliwie, próba powiązania zwiększonej aktywności szlaku kinureninowego a zaburzeniami metabolizmu kostnego w przebiegu PChN jest całkowicie nowym spojrzeniem na osteodystrofię nerkową.

Zebrane w publikacji dowody na kumulację metabolitów szlaku kinureninowego w przebiegu przewlekłej niewydolności nerek i ich wpływ na zaburzenia metabolizmu kostnego Doktorant umiejętnie wykorzystał w rozdziale „Wprowadzenie”, w którym przypomniał krótko definicję przewlekłej choroby nerek (PChN), podstawowe kryteria rozpoznania, częstość występowania oraz pojawiające się w miarę zmniejszenia się przesączania kłębuszkowego (GFR) powikłania ze strony różnych narządów i układów. Szczególny nacisk położył na zaburzenia gospodarki hormonalnej, zaburzenia mineralno-kostne w przebiegu PChN, przemianę tryptofanu na drodze szlaku kinureninowego i serotoniowego oraz wpływ metabolitów tryptofanu na rozwój zaburzeń tkanki kostnej.

Wprowadzenie napisane jest przystępnym językiem, zawiera informacje zgodne z obecnym stanem wiedzy i ułatwia zrozumienie celu niniejszej rozprawy.

Do badań wchodzących w skład niniejszej rozprawy Doktorant wykorzystał materiał biologiczny (surowica, mocz, kość udowa, jelito cienkie) wcześniej pobrany i zabezpieczony (temp. -80°C) od zwierząt z doświadczalną niewydolnością nerek w trakcie realizacji grantu. Materiał biologiczny pochodził od 5 grup szczurów, tj. grupy kontrolnej, poddanej tzw. „operacji pozorowanej”, która polegała na przecięciu powłok skórnych oraz wypreparowaniu z otoczek łącznotkankowych obu nerek, bez naruszenia ich struktury (n=10) oraz 4 grup szczurów u których wywołano indukowaną eksperymentalnie niewydolność nerek poprzez zabieg 5/6 subtotalnej nefrektomii (n = 16 każda); grupa nieleczona, grupa otrzymująca rozpuszczalnik, grupy otrzymujące LP53340 w dawkach 30 mg/kg i 100 mg/kg przez 8 tygodni.

W ramach niniejszej rozprawy doktorskiej Doktorant oznaczył stężenia tryptofanu i kinureiny w surowicy, moczu oraz w homogenacie uzyskanym z tkanki kostnej (część korowa, część beleczkowa) oraz jelita cienkiego za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej. Natomiast poziom ekspresji genu 2,3-dioksygenazy tryptofanu (TDO) ocenił za pomocą metody ilościowej reakcji łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym.

Metodyka i wyniki badań stanowiące podstawę rozprawy doktorskiej zostały już ocenione przez recenzentów czasopisma, w którym ukazała się praca i merytorycznie nie budzą żadnych zastrzeżeń. Adekwatnie zastosowano właściwe grupy kontrolne i testy statystyczne. Dyskusja prowadzona jest wielokierunkowo i dowodzi dużej erudycji Doktoranta i doskonałej znajomości piśmiennictwa fachowego. Wnioski ujęte w 4 punktach,

są zgodne z zyskanymi wynikami, poprawnie sformułowane i stanowią zwarte podsumowanie głównych rezultatów rozprawy.

Doktorant po raz pierwszy wykazał obecność zależnego od 2,3-dioksygenazy tryptofanowej (TDO), parakrynnego układu kinureninowego w tkance kostnej szczurów z PChN. Po drugie, modulacja tego szlaku przez podanie inhibitora hydroksylazy tryptofanowej (LP533401) wiązała się z pogorszeniem parametrów mineralnych kości. Po trzecie, zmiany ekspresji TDO w tkance kostnej zwierząt z PChN po podaniu LP533401 mogą być powiązane z zaburzeniami w równowadze stężeń pomiędzy obwodową serotoniną a 25-hydroksywitaminą D. Po czwarte, istnieją ściśle powiązania pomiędzy nasileniem ekspresji genów uczestniczących w osteoblastogenezie, a zależną od TDO aktywacją szlaku kinureninowego w tkance kostnej szczurów mocznicowych po podaniu LP533401. Uzyskane wyniki są oryginalne i posiadają znaczącą wartość poznawczą, stanowiąc kolejny krok w poznaniu roli metabolitów tryptofanu w rozwoju osteodystrofii nerkowej.

W zamieszczonym streszczeniu (w języku polskim i w języku angielskim), Doktorant zawarł podsumowanie zagadnień omawianych w rozprawie oraz wnioski z przeprowadzonych badań.

Rozprawa doktorska zawiera piśmiennictwo obejmujące 92 pozycje literatury, wymienione według kolejności cytowania w tekście rozprawy. Literatura naukowa cytowana w niniejszym opracowaniu jest odpowiednio dobrana i właściwie wykorzystana, zarówno we wstępie, jak i w podsumowaniu wyników i dyskusji. Należy zaznaczyć, że ponad 35 % pozycji piśmiennictwa stanowią publikacje z ostatnich 5 lat (2015 – 2020). Dodatkowo piśmiennictwo zawarte jest w każdej z opublikowanych prac.

W podsumowaniu stwierdzam, że przedstawioną do recenzji rozprawę doktorską mgr Adriana Łukasza Mora pt. : „Wpływ inhibitora hydroksylazy tryptofanu – LP533401 na parakrynną układ kinureninowy tkanki kostnej w doświadczalnym modelu przewlekłej choroby nerek ” jako całość oceniam wysoce pozytywnie. Praca charakteryzuje się trafnością wyboru tematu, została dobrze zaplanowana, konsekwentnie zrealizowana i stanowi kolejny krok w poznawaniu wpływu metabolitów tryptofanu na rozwój osteodystrofii nerkowej.

Wartość poznawcza pracy, zakres badań oraz uzyskane wyniki upoważniają do wyciągnięcia wniosku, że rozprawa spełnia wymagania określone w Ustawie o stopniach naukowych i tytule Naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2003, Nr 65 poz. 595, wraz późniejszymi zmianami), w związku z powyższym wnioskuję o dopuszczenie mgr Adriana Łukasza Mora do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Prof. dr hab. Barbara Filipek