



UNIWERSYTET MEDYCZNY W LUBLINIE
KATEDRA FARMAKOLOGII DOŚWIADCZALNEJ I KLINICZNEJ

ul. Jaczewskiego 8b (Collegium Pathologicum), 20-090 Lublin

tel.: +48 81448 6450; faks: +48 81448 6451

e-mail tomasz.kocki@umlub.pl

Prof. dr hab. n. med. Tomasz Kocki

Lublin, dnia 30 czerwca 2021 r.

O C E N A

pracy doktorskiej mgr Adriana Łukasza Mora

Wpływ inhibitora hydroksylazy tryptofanu – LP533401 na parakrynnny układ kinureninowy tkanki kostnej w doświadczalnym modelu przewlekłej choroby nerek

Tematyka badawcza podjęta przez Pana mgr **Adriana Łukasza Mora** dotyczy istotnego zagadnienia z dziedziny nefrologii - przewlekłej choroby nerek. Dane statystyczne mówią o ponad 9% osób dorosłych cierpiących na tą chorobę ludzi na świecie. Jednak w starszym wieku jest ona znacznie częstsza i występuje nawet u 30% osób powyżej 65 roku życia.

Rozwój choroby wiąże się z upośledzeniem czynności wydalniczej, wewnątrzwydzielniczej i metabolicznej nerek co wywołuje liczne objawy i powikłania ze strony różnych narządów i układów. Najczęstsze zaburzenia homeostazy organizmu związane z rozwojem przewlekłej choroby nerek obejmują niewydolność układu krążenia, kwasicę metaboliczną, miażdżycę tętnic i zakrzepicę prowadzące do częstego występowania incydentów sercowo-naczyniowych. Ponadto uszkodzenia układu pokarmowego takie jak wrzód trawienny żołądka lub dwunastnicy a także zaburzenia endokrynologiczne, neurologiczne oraz mineralne i kostne. U pacjentów z przewlekłą chorobą nerek obserwuje się również nieprawidłowości w obrębie gospodarki aminokwasowej a w szczególności charakterystyczne zmiany metabolitów tryptofanu w obrębie układu kostnego.

Rozprawa doktorska Pana mgr **Adriana Łukasza Mora** pt. „*Wpływ inhibitora hydroksylazy tryptofanu – LP533401 na parakrynnny układ kinureninowy tkanki kostnej w doświadczalnym modelu przewlekłej choroby nerek*” wpisuje się doskonale w tą tematykę badawczą.

Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska została wykonana w Zakładzie Farmakodynamiki, Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku pod kierunkiem Prof. dr hab. Dariusza Pawlaka. Praca doktorska została przygotowana na podstawie dwóch artykułów naukowych opublikowanych w czasopiśmie z listy MNiSW. Pierwsza z publikacji jest pracą pogładową (punktacja MNiSW=100 pkt), natomiast druga to praca oryginalna (IF=4,556, punktacja MNiSW=140). We wszystkich pracach naukowych Doktorant jest pierwszym autorem, co wskazuje na jego wiodący udział w przygotowaniu prac do publikacji. Jego wkład został określony na 80% i 75% zgodnie z dołączonymi oświadczeniami innych współautorów publikacji. Należy podkreślić, że prace naukowe stanowiące podstawę niniejszej dysertacji zostały pozytywnie zrecenzowane i opublikowane w punktowanych czasopiśmie naukowych co wskazuje, że merytorycznie nie budzą żadnych zastrzeżeń. Tytuł pracy doktorskiej odpowiada tematyce zamieszczonej w publikacjach.

Praca doktorska obejmuje 69 stron oprawionego wydruku komputerowego formatu A4 i obejmującego 13 rozdziałów: wykaz publikacji będących podstawą rozprawy doktorskiej, wprowadzenie, cel pracy, realizacja celów naukowych, materiały i metody badawcze, podsumowanie wyników badań i dyskusja, wnioski, piśmiennictwo, streszczenie w j. polskim i w j. angielskim, kserokopię dwóch publikacji stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej, oświadczenia autora oraz współautorów o charakterze udziału i procentowym wkładzie w przygotowaniu publikacji naukowych stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej, skan zgody Lokalnej Komisji Etycznej do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach oraz dorobek naukowy Doktoranta.

W spisie treści Doktorant użył niefortunnego stwierdzenia „oświadczenia współautorów rozprawy doktorskiej”, a są to współautorzy prac będących podstawą rozprawy doktorskiej. Ponadto Autor mimo wskazania numerów stron w spisie treści nie umieścił ich na odpowiednich stronach w tekście Dysertacji.

Rozprawę otwiera rozdział „Wprowadzenie” w którym Autor przedstawił w bardzo przystępny sposób najbardziej istotne zagadnienia związane z podjętym przez niego problemem badawczym. W sposób przejrzysty autor opisuje zaburzenia w poziomach metabolitów tryptofanu w przebiegu przewlekłej niewydolności nerek oraz ich wpływ na

tkankę kostną. Większą część rozdziału została poświęcona na opis zmian procesów metabolicznych w obrębie tkanki kostnej pod wpływem jednego z głównych metabolitów tryptofanu – kynureniny, w szczególności jej agonistyczny wpływ na aktywność receptora AhR. Nasiloną aktywacją AhR może prowadzić do niekorzystnych zmian w metabolizmie kostnym. W osteoblastach powoduje ona zahamowanie ich proliferacji i różnicowania, natomiast w przypadku osteoklastów stymulacja AhR powoduje wzrost ich aktywności i nasilenie procesu resorpcji kości. Przeprowadzona analiza piśmiennictwa dotycząca podjętego tematu badawczego stanowi bardzo dobre wprowadzenie do przedstawionych następnie celów naukowych pracy doktorskiej.

W oparciu o przesłanki przedstawione we Wprowadzeniu został precyzyjnie sformułowany nowatorski cel rozprawy, którym było ustalenie czy tkanka kostna posiada parakrynnny układ kynureninowy oraz wskazanie jego ewentualnego wpływu na metabolizm kostny oraz ocena czy farmakologiczna modulacja aktywności obwodowej hydroksylazy tryptofanowej (TPH-1) przez LP533401 może wpływać na aktywność szlaku kynureninowego w tkance kostnej szczurów poddanych nefrektomii oraz określenie podłoża i potencjalnych konsekwencji tego procesu związanych z osteogenezą, regulacją gospodarki mineralnej i metabolizmem kostnym.

Materiał biologiczny do części doświadczalnej pracy naukowej uzyskano w czasie badań eksperymentalnych związanych z realizacją grantu pt.: „Hamowanie aktywności hydroksylazy tryptofanu typu I - nowa koncepcja leczenia zaburzeń metabolizmu kostnego w przewlekłej niewydolności nerek”, finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki.

Jako metody badawcze Autor wykorzystał technikę wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) oraz metodę ilościowej reakcji łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym (qT-PCR). Szkoda, że Doktorant opisując powyższe metody badawcze nie wspomniał o pomiarach densytometrycznych, których wyniki zostały przedstawione w drugiej publikacji naukowej.

Pierwsza praca o charakterze przeglądowym pt. *Kynurenine Pathway in Chronic Kidney Disease: What's Old, What's New, and What's Next?* została opublikowana w *International Journal of Tryptophan Research* i jest wprowadzeniem w tematykę badań którymi zajmuje się Doktorant. W pracy naukowej Autor przedstawił fizjologiczny szlak przemian tryptofanu na ścieżce kynureninowej, a następnie dokładnie zebrał i usystematyzował doniesienia dotyczące wiedzy na temat związku metabolitów szlaku kynureninowego z zaburzeniami ogólnoustrojowymi towarzyszącymi rozwojowi przewlekłej

choroby nerek. Metabolity tego szlaku wykazują zróżnicowaną, niekiedy przeciwstawną rolę w wielu procesach biologicznych. Ich nagromadzenie w przebiegu przewlekłej choroby nerek może indukować oksydacyjne uszkodzenie komórek, co stymuluje procesy zapalne. Doktorant wskazał również, że kynureniny mogą modulować aktywność licznych komórkowych szlaków sygnałowych poprzez aktywację receptora węglowodorów arylowych, prowadząc do zaburzeń homeostazy ogólnoustrojowej. W podsumowaniu Autor zaproponował praktyczne zastosowanie inhibitorów szlaku kynureninowego co mogłoby przynajmniej częściowo przyczynić się do zmniejszenia nasilenia zaburzeń związanych z przewlekłą chorobą nerek.

W drugim artykule oryginalnym pt. „*The modulation of the paracrine kynurenic system in bone as a new regulator of osteoblastogenesis and bone mineral status in animal model of chronic kidney disease treated with LP533401*” opublikowanym w czasopiśmie International Journal of Molecular Sciences, Doktorant jednoznacznie wykazał obecność parakrynego układu kynureninowego występującego w tkance kostnej szczurów, który pozostawał elementem niezależnym od obwodowej puli tego układu. Autor wskazał także, że modulacja aktywności szlaku kynureninowego zaobserwowana podczas hamowania aktywności hydroksylazy tryptofanowej przez inhibitora hydroksylazy tryptofanu wiązała się z istotnym statystycznie pogorszeniem parametrów mineralnych kości. Ponadto stwierdził występowanie zależności pomiędzy zmianami w poziomie ekspresji genu 2,3-dioksygenazy tryptofanowej, odpowiedzialnej za aktywność szlaku kynureninowego w tkance kostnej zwierząt po podaniu LP533401, a zaburzeniami równowagi między obwodowymi stężeniami 5-HT i 25(OH)D, a także zależności pomiędzy poziomem ekspresji genów uczestniczących w regulacji osteoblastogenezy i zależną od TDO aktywacją szlaku kynureninowego w tkance kostnej szczurów mocznicowych otrzymujących LP533401.

Dyskusja została przeprowadzona prawidłowo. Autor wnikliwie analizuje wyniki własne zawarte w publikacji oryginalnej oraz przedstawia swoje hipotezy dotyczące omawianego tematu. **Jednak proszę o szersze wyjaśnienie dlaczego niższa zastosowana dawka (30 mg/kg) w porównaniu z wyższą użytą dawką (100 mg/kg) powodowała najsilniejszy spadek poziomu ekspresji TDO u zwierząt doświadczalnych?**

Wnioski stanowiące logiczne podsumowanie wyników rozprawy doktorskiej zawarto w 4 punktach.

Podczas analizy wniosków nasunęło mi się pytanie który z trzech szlaków kynureninowych: ośrodkowy, obwodowy czy kostny przeważa w regulacji zmian w obrębie geometrii, wytrzymałości i mikroarchitektury kości?

Streszczenia w języku polski i angielskim prezentują najważniejsze problemy i zagadnienia omawiane w pracy doktorskiej.

Nieliczne zauważone uwagi natury edytorskiej nie umniejszają pozytywnej wartości dysertacji.

Z naukowego punktu widzenia za najbardziej interesujące i znaczące osiągnięcie recenzowanej pracy uważam wskazanie, że tkance kostnej szczurów obecny jest zależny od 2,3-dioksygenzy tryptofanowej (TDO) parakrynnny układ kynureninowy.

Podsumowując rozprawę doktorską Pana mgr Adriana Łukasza Mora pt.: *„Wpływ inhibitora hydroksylazy tryptofanu – LP533401 na parakrynnny układ kinureninowy tkanki kostnej w doświadczalnym modelu przewlekłej choroby nerek”* oceniam pozytywnie, a uzyskane przez Doktoranta nowatorskie wyniki z pewnością przyczynią się do lepszego zrozumienia omawianej tematyki.

Przedstawiając powyższą recenzję zwracam się do Kolegium Nauk Farmaceutycznych Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku o dopuszczenie Pana mgr Adrian Łukasza Mora do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Lublin, dn. 30 czerwca 2021 r.