



**Instytut Farmakologii
Polskiej Akademii Nauk**

INSTYTUT FARMAKOLOGII
POLSKIEJ AKADEMII NAUK
ul. Smętna 12
31-343 Kraków
Dyrektor
telefon: (12) 662 32 96
(12) 637 48 93

Centrala
telefon: (12) 662 32 20
(12) 637 40 22
fax: (12) 637 45 00
e-mail: ifpan@if-pan.krakow.pl
www.if-pan.krakow.pl

dr hab. Zofia Rogóż
Zakład Farmakologii.
Instytut Farmakologii PAN
ul. Smętna 12, 31-343 Kraków
tel. (12) 662 32 79
e-mail: rogoz@if-pan.krakow.pl

OCENA

rozprawy doktorskiej pt. „**Perspektywy farmakologicznego działania kwasu liponowego w aspekcie nowych możliwości jego biologicznej aktywności**” wykonanej przez Panią **mgr Annę Bilską-Wilkosz** w Katedrze Biochemii Lekarskiej Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum, pod kierunkiem promotora Pani prof. dr hab. Lidii Włodek.

Formalna charakterystyka pracy

Rozprawa doktorska Pani mgr Anny Bilskiej-Wilkosz została opracowana zgodnie z nowymi wytycznymi wynikającymi ze znowelizowanej Ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki z dnia 14. 03. 2003 roku, z późniejszymi zmianami. Przedłożona do oceny rozprawa doktorska pod tytułem „**Perspektywy farmakologicznego działania kwasu liponowego w aspekcie nowych możliwości jego biologicznej aktywności**” jest opisana na 87 stronach, składa się z 9-ciu kolejnych części; tj. wykaz prac stanowiące podstawę rozprawy doktorskiej, spis treści, wykaz najważniejszych skrótów, wstęp, cel pracy, omówienie wyników pracy od 1 do 3, dyskusja uzyskanych wniosków i podsumowanie, streszczenie w języku polskim i angielskim oraz bibliografia, na którą składa się 93 pozycje. Cykl trzech prac stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej, spójnych tematycznie, oryginalnych artykułów naukowych z lat 2015-2017, opublikowano w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym: Acta Polonica Pharmaceutica - Drug Research (2 prace) i Molecules (1 praca). Łączny współczynnik oddziaływania publikacji wynosi 4.483, co przekłada się na 60 punktów ministerialnych, z uwagi na fakt, iż obydwa periodyki są umieszczone w wykazie A czasopism naukowych, ogłoszonych przez MNiSW w grudniu 2015 roku. Na podkreślenie zasługuje fakt, że

Doktorantka jest pierwszym autorem we wszystkich trzech publikacjach, a efekty w nich opisane są wynikiem pracy zespołowej, potwierdzone pisemnymi oświadczeniami, w których współautorzy określili swoje zaangażowanie.

Składające się na rozprawę doktorską oryginalne prace badawcze były poddane ocenie i wnikliwej analizie przez redakcje czasopism i niezależnych recenzentów, a fakt opublikowania ich w prestiżowych czasopismach wskazuje na wysoką wartość naukową. Dlatego moja rola jako recenzenta tak przygotowanej rozprawy doktorskiej sprowadza się raczej do oceny polskojęzycznego autoreferatu, będącego autorskim opracowaniem Doktorantki, prezentującym Jej zasób wiedzy, umiejętność formułowania wniosków i posługiwania się piśmiennictwem naukowym.

Merytoryczna ocena dysertacji

Rozprawa doktorska Pani mgr Anny Bilskiej-Wilkosz jest kontynuacją szerokich badań prowadzonych w grupie Pani prof. dr hab. Lidii Włodek, dotyczących profilu biochemicznego endogennego i egzogenego kwasu liponowego. Praca ta, jak i zainteresowanie naukowe Doktorantki, dobrze wpisuje się w postępowy nurt badań naukowych jakim jest poszerzenie wiedzy dotyczącej mechanizmów biologicznej aktywności kwasu liponowego (LA) ze źródeł egzogenych. Należy podkreślić, iż mimo licznych badań, wskazujących na korzystne działanie LA w różnych stanach patologicznych, mechanizmy poprzez które wpływa na procesy zachodzące w żywych komórkach nie zostały w dużym stopniu rozpoznane. Stąd wybór przedmiotu badań oraz ich zakres przedstawiony w rozprawie jest racjonalny.

Na 17 stronach Wprowadzenia, Doktorantka w sposób niezwykle syntetyczny przedstawiła profil biochemiczny endogenego kwasu liponowego, podkreślając, iż udział LA oraz jego zredukowanej postaci – kwasu dihydroliponowego (kwasu 6,8-ditiooktanowego, DHLA) wymaga 7 reakcji o istotnym, kluczowym znaczeniu dla metabolizmu energetycznego komórki i procesach tworzenia energii (schemat tych reakcji umieszczono na Ryc. 3., 13 str. rozprawy),

W kolejnym podrozdziale Wprowadzenia, Autorka opisuje mechanizm farmakologicznej aktywności LA/DHLA, podkreślając, iż mimo obecności w bibliograficznej bazie PubMed ponad 5000 pozycji literaturowych, mechanizm jego biologicznej aktywności w znacznym stopniu pozostaje niewyjaśniony.

CELEM zaplanowanych badań było poszerzenie wiedzy dotyczącej mechanizmów biologicznej aktywności LA ze źródeł egzogennych. Obecnie, mimo dużej ilości badań, stwierdzających korzystne działanie tego związku w różnych stanach patologicznych, mechanizmy poprzez które wpływa on na procesy zachodzące w komórkach organizmu żywego pozostają w dużym stopniu nie wyjaśnione.

W kolejnym etapie niniejszej pracy prześledzono wpływ tiazotanu glicerolu (GTN) i LA na aktywność dihydrogenazy aldehydowej (ALDH) w warunkach *in vivo* i *in vitro*. Problematyka ta ściśle łączy się ze zjawiskiem tolerancji na GTN, którego mechanizm wciąż nie jest w pełni wyjaśniony. Ponadto badania te zwracają uwagę na mało jeszcze dostrzegalny problem odmiennego działania LA w warunkach *in vivo* i *in vitro*.

W niniejszej pracy podjęto również próbę wyjaśnienia, czy LA włącza się w przemiany reaktywnych form siarki, tj. siarki sulfonowej i H_2S oraz sprawdzono czy LA i DHLA same mogą być źródłem reaktywnych form siarki (tj. siarki sulfonowej).

Zaplanowane badania zostały podjęte zarówno na interesujący aspekt poznawczy, jak i ze względu na możliwość wykorzystania uzyskanych wyników w praktyce medycyny klinicznej.

Rozdział WYNIKI składa się z trzech podrozdziałów, w których Doktorantka opisała uzyskane wyniki, dzieląc je na efekty otrzymane w kolejnych trzech opublikowanych prac.

Wyniki badań (*in vivo*) zamieszczone w **PRACY 1** zostały wykonane we współpracy z Katedrą Farmakodynamiki Wydziału Farmaceutycznego UJ, CM (kierowaną przez Panią prof. dr hab. Barbarę Filipek). Przeprowadzone badania zaprezentowane w niniejszej pracy wykazały, że GTN jest silnym inhibitorem aktywności katalitycznej ALDH zarówno w warunkach *in vivo*, jak i *in vitro*. W warunkach *in vitro* LA oraz DHLA chronią aktywność ALDH przed hamującym wpływem GTN, jak również są zdolne do przywrócenia już zahamowanej przez GTN aktywności katalitycznej ALDH. W warunkach *in vivo* podawanie szczurom LA nie chroni aktywności wątrobowej ALDH przed hamującym wpływem GTN. Uzyskane wyniki wskazują na fakt, iż efekty biologiczne LA w warunkach *in vitro* mogą różnić się od tych, które obserwujemy *in vivo*.

Wyniki badań (*in vivo*) zamieszczone w **PRACY 2** zostały również wykonane we współpracy z Katedrą Farmakodynamiki Wydziału Farmaceutycznego UJ, CM (kierowaną przez Panią prof. dr hab. Barbarę Filipek). Uzyskane rezultaty badań *in vivo* potwierdzają, że jednym z mechanizmów biologicznej aktywności LA jest jego wpływ na przemiany związków posiadających siarkę sulfonową. Jest to teza nowa, do tej pory w niewielkim

stopniu podnoszona przez innych autorów. Jak podkreśliła Doktorantka, potrzebne są jednak dalsze badania w celu lepszego poznania mechanizmów tego procesu.

Wyniki badań *in vitro* PRACY 3, w obecności homogenatów wątroby i nerki szczura wy skazują, że w obecności LA i DHLA w badanych tkankach obniża się poziom siarki sulfonowej, czemu towarzyszy wzrost poziomu H_2S . Oznacza to, że w obecności LA i DHLA dochodzi do uwolnienia H_2S z siarki sulfonowej zmagazynowanej w tkankach. Jak wynika z zastosowanych warunków eksperymentalnych LA i DHLA nie uwalniają siarki sulfonowej, a jedynie biorą udział w przekształcaniu endogennych związków z siarki sulfonowe. Oznacza to, że w opisanym układzie doświadczalnym nie udało się udowodnić obecności w tkankach szczura enzymu o aktywności desulfurazy, katalizującego proces rozkładu wiązania C-S.

W rozdziale DYSKUSJA, Doktorantka przedstawiła zakres prac wykonanych w ramach trzech, załączonych do rozprawy doktorskiej publikacji, podejmując również próbę interpretacji i dyskusji otrzymanych wyników. Prace te są logicznie powiązane z cytowanym piśmiennictwem dotyczącym tematyki dysertacji. Wnioski z przeprowadzonych badań są bardzo czytelne. Również polskojęzycznego autoreferatu, będącego autorskim opracowaniem Doktorantki, prezentującym Jej bardzo duży zasób wiedzy, umiejętność formułowania wniosków i posługiwania się piśmiennictwem naukowym. Autoreferat został bardzo starannie opracowany.

Podsumowanie

Należy stwierdzić, że uzyskane przez Doktorantkę wyniki wzbogacają naszą dotychczasową wiedzę w nowe informacje na temat mechanizmów biologicznej aktywności LA oraz jego udziału w metabolicznych przemianach reaktywnych form siarki, to znaczy siarki sulfonowej i H_2S . Ponadto wielokierunkowe działanie regulatorowe RFS manifestujące się poprzez zmianę aktywności wielu białek enzymatycznych i receptorowych może tłumaczyć skuteczność podawania LA w tak wielu różnych, często odległych stanach patologicznych. Wyniki badań Doktorantki pozwalają na postawienie nowych hipotez naukowych, popartych argumentacją na podstawie uzyskanych własnych rezultatów i w oparciu o dane eksperymentalne cytowanych autorów. Pani mgr Anna Bilaska-Wilkosz wykazała się doskonałym opanowaniem wielu technik badawczych z zakresu biochemii eksperymentalnej. Sprostanie wymogom redakcyjnym prestiżowych wydawnictw świadczy też o umiejętności opracowywania wyników, ich krytycznej analizie i pogłębionej znajomości

przedmiotu. Duża wartość rozprawy wynika z kompleksowego podejścia do rozpatrywanego problemu oraz zastosowania odpowiednio dobranych metod badawczych.

Wniosek końcowy

Przedstawiona do oceny praca pt „Perspektywy farmakologicznego działania kwasu liponowego w aspekcie nowych możliwości jego biologicznej aktywności” spełnia wszystkie wymagania określone w artykule 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki z późniejszymi zmianami, stawiane pracom doktorskim. W związku z powyższym przedkładam Wysokiej Radzie Wydziału Farmaceutycznego UJ CM, wniosek o dopuszczenie Pani mgr Anny Bilskiej-Wilkosz do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Równocześnie składam wniosek do Wysokiej Radzie Wydziału Farmaceutycznego UJ CM, o wyróżnienie pracy. Podstawą wyróżnienia mogą być istotne wartości poznawcze opracowanego problemu, merytoryczne poprawne przeprowadzenie, nietrywialnych metodologicznie badań oraz stosowne opracowanie wyników doświadczalnych w formie trzech publikacji w prestiżowych czasopismach naukowych, które stały się podstawą dysertacji.

Kraków, 10. 01. 2018 rok



dr hab. Zofia Rogóż