



Warszawa, 24 kwietnia 2019 r.

OCENA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

mgr Moniki Kłozy

p.t. „Wpływ nadciśnienia oraz przewlekłego podawania inhibitora FAAH URB597 na zależną od śródbłonka hiperpolaryzację i rozkurcz małych tętnic kreczkowych szczura”

wykonanej w Zakładzie Fizjologii i Patofizjologii Doświadczalnej
Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku

pod promotorską opieką *dr hab. n. med. Hanny Kozłowskiej*

Ogólna częstość występowania nadciśnienia tętniczego na świecie wśród osób dorosłych wynosi 30–45%, a u osób po 60 roku życia ponad 60%. Ze względu na starzenie się społeczeństwa, wzrost przeciętnej masy ciała i niską aktywność fizyczną, częstość rozpoznawania nadciśnienia tętniczego na świecie będzie rosła. Szacuje się, że liczba osób z nadciśnieniem tętniczym w 2025 przekroczy 1,5 miliarda. Istnieje wiele dobrze tolerowanych i bezpiecznych strategii farmakoterapii, które wsparte zmianą stylu życia istotnie redukują ciśnienie tętnicze. Pomimo tego skuteczność leczenia nadciśnienia na całym świecie pozostaje nadal niska. Nadciśnienie tętnicze jest głównym modyfikowalnym elementem ryzyka chorób układu sercowo-naczyniowego i śmiertelności ogólnej. Stąd istnieje pilna potrzeba poszukiwania nowych, bardziej spersonalizowanych terapii, dostosowanych do stanu chorego, jego wieku i płci, a także do podłoża patofizjologicznego nadciśnienia i stopnia jego zaawansowania. W ostatnich dekadach dokonano znacznego postępu w zakresie zrozumienia patofizjologii nadciśnienia tętniczego. Jednak ze względu na fakt, że regulacja ciśnienia tętniczego krwi jest jednym z bardziej skomplikowanych procesów ustroju, pole do badań jest ogromne, a lepsze zrozumienie tego złożonego procesu niezbędne do poprawy skuteczności leczenia.

Śródbłonek naczyniowy pełni kluczową rolę w regulacji napięcia ścian naczyń krwionośnych poprzez syntezę i uwalnianie substancji naczyniorozszerzających, takich jak tlenek azotu (NO) i prostacyklina I₂ (PGI₂). Ważną rolę pełni również hiperpolaryzacja mięśni gładkich ściany naczyniowej zależna od śródbłonka (EDH). Rola tego mechanizmu w rozkurczu naczyń jest odwrotnie proporcjonalna do średnicy naczynia i wydaje się być największa w naczyniach o małej średnicy i funkcji oporowej odpowiedzialnych za regulację ciśnienia krwi. Zjawisko to angażuje szereg elementów śródbłonkowych i obecnych w mięśniówce gładkiej tworzących skomplikowaną

kaskadę sygnalizacyjną, której nie wszystkie elementy są zrozumiałe. Wiadomym jest, że ważną rolę w tym procesie pełnią śródbłonkowe kanały potasowe o średniej ($K_{Ca3.1}$) i małej ($K_{Ca2.3}$) przewodności oraz ich białka efektorowe zlokalizowane w mięśniówce gładkiej: pompa sodowo-potasowa (Na^+/K^+ -ATP-aza) i potasowe kanały dokomórkowo prostownicze ($K_{IR2.1}$). Jednak wpływ nadciśnienia na EDH oraz na funkcję i ekspresję tych kanałów nie jest do końca wyjaśniony. Badania nad zjawiskiem EDH prowadzono w różnych modelach nadciśnienia w tym DOCA-salt i SHR, ale ich wyniki często są odmienne, prawdopodobnie dlatego, że dotyczą naczyń o różnych średnicach i odmiennej lokalizacji u zwierząt w różnym wieku i z różnym stopniem zaawansowania nadciśnienia. Istnieje więc potrzeba dalszych badań, szczególnie tych prowadzonych w małych naczyniach oporowych odpowiedzialnych za regulację ciśnienia krwi. Ze względu na fakt, że istnieją już syntetyczne aktywatory $K_{Ca3.1}$ i $K_{Ca2.3}$ i ciągle są opracowywane nowe związki o coraz większej selektywności względem tych kanałów, ważnym elementem tych badań powinny być wapniozależne kanały potasowe. Stwarza to szansę na zastosowanie ich aktywatorów jako potencjalnych leków obniżających ciśnienie tętnicze krwi.

Mając powyższe na uwadze, Pani Mgr Monika Kloza jako cel nadrzędny swojej rozprawy doktorskiej obrała poszerzenie wiedzy o zjawisku EDH w nadciśnieniu tętniczym. Podczas realizacji tego zadania zaplanowała dwa cele szczegółowe. Były nimi: (1) zbadanie wpływu pierwotnego i wtórnego nadciśnienia tętniczego na odpowiedź rozkurczową zależną od EDH w małych tętnicach krezkowych szczura oraz (2) zbadanie w tym zjawisku roli kanałów $K_{Ca3.1}$ i $K_{Ca2.3}$ oraz endokannabinoidów i/lub ich metabolitów. **Cele rozprawy są uzasadnione naukowo o ważnym znaczeniu poznawczym a także o potencjalnym znaczeniu klinicznym związanym z możliwością zastosowania aktywatorów kanałów $K_{Ca3.1}$ i $K_{Ca2.3}$ w leczeniu nadciśnienia tętniczego.**

Ocena formalna rozprawy

Rozprawa doktorska Pani mgr Moniki Klozy ma postać cyklu publikacji, na który składają się dwie prace oryginalne i 1 praca pogładowa. Prace zostały opublikowane w latach 2017-2019 w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym (*International Journal of Molecular Science, Vascular Pharmacology* oraz *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*). Współczynnik oddziaływania prac *Impact Factor* wynosi odpowiednio dla prac oryginalnych **4.183** (140 pkt. MNiSW zgodnie z aktualną listą czasopism opublikowaną przez MNiSW, przy maksymalnej punktacji na tej liście wynoszącej 200 pkt.), **3.607** (35 pkt. MNiSW zgodnie z listą aktualną w 2017 r. przy maksymalnej punktacji na tej liście wynoszącej 50 pkt.) oraz **1.106** dla pracy pogładowej (40 pkt. MNiSW zgodnie z aktualną listą). Łączny *Impact Factor* cyklu prac wynosi **8.896**. Praca opublikowana w 2017 r. była cytowana 6 razy (wg. bazy *Web of Science*), dwie pozostałe prace nie mają jeszcze cytowań ze

względem na bardzo krótki czas, który upłynął od ich publikacji. We wszystkich pracach Doktorantka jest pierwszą autorką i swój udział w powstaniu tych prac ocenia odpowiednio na 60, 60 i 70%. Współautorzy wyrazili zgodę na włączenie wyżej wymienionych prac do cyklu publikacji stanowiących rozprawę doktorską Pani mgr Moniki Kłoczy.

Cykl publikacji został uzupełniony 50 stronicowym opracowaniem zawierającym wprowadzenie do tematyki pracy, cel rozprawy, skrócony opis metod, omówienie wyników wraz z dyskusją, wnioski, bibliografię oraz streszczenia w języku polskim i angielskim. Uzupełnienie stanowi spis dotychczasowych osiągnięć Doktorantki imponujący jak na ten etap kariery naukowej (14 pełnotekstowych publikacji o łącznym współczynniku oddziaływania $IF=37.935$).

Przedstawiony mi do oceny materiał jest przygotowany bardzo starannie, w mojej ocenie wzorcowo. Wyniki badań zostały opublikowane w dobrych czasopismach, przeszły zatem wymagający proces recenzji i spełniły wysokie wymagania stawiane w renomowanych czasopismach naukowych, zarówno co do poziomu merytorycznego, jak i językowego oraz edytorskiego. Omówienie prac jest napisane dobrym językiem i daje kompleksowy wgląd w tematykę badań, uzyskane wyniki oraz ich odniesienie do istniejącego w tym obszarze stanu wiedzy.

Ocena merytoryczna rozprawy

W przeprowadzonych badaniach wykorzystano szczurze modele nadciśnienia tętniczego: szczury ze spontanicznym nadciśnieniem tętniczym (SHR), będące modelem nadciśnienia pierwotnego u ludzi oraz model DOCA-salt, w którym nadciśnienie jest indukowane za pomocą octanu deoksykortykosteronu i diety wysokosodowej oraz jednostronnej nefrektomii, będące modelem nadciśnienia wtórnego u ludzi, którego najczęstszym induktorem jest niewłaściwa dieta i stres. Zapewniono grupy kontrolne (odpowiednio szczury WKY i WKY po jednostronnej nefrektomii – UNX). Badania przeprowadzono na izolowanych tętnicach krezkowych o funkcji oporowej (trzecie odgałęzienie od tętnicy krezkowej górnej). W naczyniach izolowanych od ww. zwierząt badano działanie rozkurczowe Ach i aktywatorów kanałów $K_{Ca3.1}$ i $K_{Ca2.x}$ (SKA-31 i NS309) w naczyniach przykurczonych za pomocą fenylefryny na tle blokerów eNOS (L-NAME), cyklooksygenazy (indometacyna), kanałów $K_{Ca3.1}$ i $K_{Ca2.x}$ (odpowiednio TRAM-34 i UCL1684) oraz białek wchodzących w skład kaskady sygnalizacyjnej tj. kanałów K_{IR} (jony Ba^{2+}) i Na^+/K^+ -ATP-azy (ouabaina). Oceniono ekspresję ww. kanałów potasowych i Na^+/K^+ -APA-zy w homogenatach tętnic krezkowych na poziomie mRNA metodą PCR oraz ekspresję kanału $K_{Ca3.1}$ na poziomie białka metodą Western blot i metodą immunohistochemiczną. W modelu nadciśnienia pierwotnego SHR przeprowadzono również badanie *in vivo* oceniając u szczurów uśpionych zmianę ciśnienia tętniczego krwi i częstości rytmu serca pod wpływem aktywatora $K_{Ca3.1}$ i $K_{Ca2.3}$ - SKA-31, a w modelu DOCA-salt dodatkowo zbadano wpływ hydrolazy amidowej kwasów tłuszczowych

(FAAH) na wazodylację naczyń w celu ustalenia wpływu endokannabinoidów i ich metabolitów na EDH.

Zastosowana w pracy metodyka badań nie budzi żadnych wątpliwości. Jest przemyślana i starannie opisana. Zapewniono właściwe kontrole, liczba zwierząt, od których pobrano tętnice do przeprowadzenia poszczególnych analiz w poszczególnych grupach waha się od 5-14. Przed właściwym badaniem sprawdzono reaktywność naczyń, funkcję śródbłónka, a dla każdej badanej substancji zbadano wpływ nośnika, w którym rozpuszczona była substancja testowana. Warto podkreślić doskonały warsztat badawczy pozwalający na preparatykę małych naczyń tętniczych w modelu szczurzym.

Liczne wyniki uzyskane przez Doktorantkę zawarte zostały w dwóch publikacjach oryginalnych. Doktorantce udało się pokazać, że w modelu nadciśnienia pierwotnego (SHR):

- aktywator kanałów $K_{Ca3.1}$ i $K_{Ca2.3}$ - SKA-31 powoduje krótkotrwały i zależny od dawki spadek ciśnienia *in vivo*, wyraźniej zaznaczony u szczurów SHR niż normotensyjnych. Najwyższa ze stosowanych dawek powoduje przejściową, ale silną bradykardię;
- rozkurczowy efekt SKA-31 i NS309 jest słabszy w tętnicach izolowanych u szczurów SHR niż u normotensyjnych. Rozkurcz zależny od EDH jest zachowany u szczurów z nadciśnieniem (pomimo spadku ekspresji $K_{Ca3.1}$ i $K_{Ca2.3}$ na poziomie mRNA), podczas gdy rozkurcz zależny od NO i PGI2 jest istotnie osłabiony, za co częściowo może być odpowiedzialny spadek ekspresji eNOS;
- oba kanały biorą udział w EDH, ale udział $K_{Ca3.1}$ wydaje się być większy, zarówno u szczurów SHR, jak i normotensyjnych;
- EDH zależy u szczurów SHR głównie od Na^+/K^+ -ATP-azy, a u szczurów normotensyjnych od kanałów $K_{IR2.1}$, co może wynikać ze wzrostu ekspresji Na^+/K^+ -ATP-azy i spadku $K_{IR2.1}$ u szczurów SHR;
- usunięcie śródbłónka hamuje rozkurcz indukowany przez SKA-31 silniej u SHR niż u zwierząt kontrolnych;
- SKA-31 wzmacnia efekt rozkurczowy acetylocholiny (Ach) u szczurów SHR.

Natomiast w modelu nadciśnienia wtórnego (DOCA-salt) Doktorantka wykazała, że:

- rozkurcz w naczyniach doprowadzających (aorta) jest prawie wyłącznie zależny od NO i PGI2 zarówno w nadciśnieniu, jak i u szczurów normotensyjnych, podczas gdy w tętnicach krezkowych o funkcji oporowej zależy głównie od EDH;
- w tętnicy krezkowej u szczurów DOCA-salt maksymalna odpowiedź rozkurczowa indukowana Ach jest niezmienną podczas gdy siła działania Ach jest obniżona;

- odpowiedź rozkurczowa zależna od EDH jest zachowana u szczurów z nadciśnieniem. Udział kanałów $K_{Ca3.1}$ w rozkurczu tętnic krezkowych aktywowany ACh u szczurów normotensyjnych jest znacznie wyższy niż $K_{Ca2.3}$. Natomiast w nadciśnieniu DOCA-salt względny udział kanałów $K_{Ca2.3}$ rośnie, co może między innymi wynikać z potwierdzonego w pracy spadku ekspresji $K_{Ca3.1}$;
- rozkurcz tętnic krezkowych pod wpływem endogennego donora NO, nitroprusydku sodu był podobny u szczurów normo- i hipertensyjnych,
- usunięcie śródbłonna istotnie upośledzało rozkurcz indukowany ACh u szczurów z nadciśnieniem i normotensyjnych;
- FAAH nie miała wpływu na odpowiedź rozkurczową tętnic krezkowych zależną od EDH i kanałów $K_{Ca3.1}$ i $K_{Ca2.3}$ pomimo tego, że zapobiegała spadkowi ekspresji kanału $K_{Ca3.1}$ w nadciśnieniu.

Doktorantka na podstawie uzyskanych wyników sformułowała 7 wniosków. W moim odczuciu wniosek nr 2 powinien zawierać odniesienie do stopnia zaawansowania nadciśnienia w użytych modelach. Pozostałe wnioski są sformułowane prawidłowo i potwierdzają realizację celów rozprawy.

W trakcie lektury tych dobrze napisanych i zaprojektowanych prac nasunęło mi się kilka pytań i komentarzy:

1. W pracy wykorzystującej model SHR użyto wyłącznie zwierząt młodych (10-12 tygodni) na wczesnym etapie rozwoju nadciśnienia, na którym relaksacja zależna od EDH jest zachowana. Z prac innych autorów (*Büssemaker et al., 2003, Kong et al., 2015, Jiang et al., 2016*) prowadzonych w tym samym modelu wynika, że wraz ze starzeniem i rozwojem nadciśnienia EDH ulega istotnemu osłabieniu. Prace te jednak nie badały rozkurczowych właściwości SKA-31, a także były przeprowadzone na innych naczyniach lub na naczyniach krezkowych o większej średnicy. Stąd istnieje pewien niedobór wiedzy dotyczący potencjalnego działania aktywatora $K_{Ca3.1}$ i $K_{Ca2.3}$ w zaawansowanym nadciśnieniu.
2. W jakim mechanizmie SKA-31 rozkurcza naczynia pozbawione śródbłonna? Ten potencjalny mechanizm wydaje się być upośledzony u szczurów SHR w porównaniu do WKY. Zidentyfikowanie go byłoby o tyle ważne, że mogłoby wskazać nowy cel terapeutyczny w nadciśnieniu?
3. W jakim mechanizmie SKA-31 rozkurcza naczynia w sposób zależny od NO i ew. PGI₂?
4. Zjawisko EDH jest zachowane u szczurów SHR pomimo, że spada ekspresja kanałów $K_{Ca3.1}$ i $K_{Ca2.3}$ (co prawda tylko na poziomie mRNA). Czy zdaniem Doktorantki sugeruje to wzmocnioną funkcję kanałów (większą wrażliwość na jony Ca^{2+} /uwapnioną kalmodulinę) w nadciśnieniu,

udział innych mechanizmów, a może jest wynikiem badania EDH na tle aktywatora $K_{Ca3.1}$ i $K_{Ca2.3}$, który może maskować spadek ekspresji kanałów?

5. Czy Doktorantka uważa, że użycie innych wazodylatorów w modelach DOCA-salt i SHR (ACh vs. SKA-31) jest przyczyną odmiennego względnego udziału kanałów $K_{Ca3.1}$ i $K_{Ca2.3}$ w zjawisku EDH u szczurów normotensyjnych (WKY) stanowiących kontrolę w obu modelach nadciśnienia?
6. Jakie znaczenie interpretacyjne dla oceny zjawiska EDH u szczurów DOCA-salt ma fakt, że zaznaczył się wyraźny trend (64.5% vs. 75.9%, Tabela 1, Rycina1 C i D) do zmniejszenia maksymalnego efektu rozkurczowego ACh (po zahamowaniu rozkurczu zależnego od NO i PGI2) u szczurów DOCA-salt w porównaniu do szczurów normotensyjnych, przy jednoczesnym zwiększeniu siły działania agonisty?

Doktorantka do cyklu publikacji dołączyła również pracę poglądową, w której omawia szczegółowo znaczenie zjawiska EDH w regulacji ciśnienia tętniczego, ilustrując go za pomocą przejrzystych rycin. Doktorantka przedstawia bieżącą wiedzę dotyczącą omawianego zjawiska odnosząc się również do własnych prac i prac Zespołu, w którym wykonała swoje badania. Opracowanie stanowi doskonałe wprowadzenie do badań zawartych w pracach oryginalnych.

Jedyna moja uwaga do pracy poglądowej dotyczy braku informacji o biofizycznych właściwościach kanałów $K_{Ca3.1}$ i $K_{Ca2.3}$, a tym samym o mechanizmie działania ich syntetycznych aktywatorów. Oba te kanały są aktywowane przez uwapnioną kalmodulinę. Czy do swojej aktywacji wymagają takiego samego stężenia jonów Ca^{2+} , czy ich wrażliwość na kalmodulinę jest odmienna? Czy odmienna lokalizacja kanałów w komórkach śródbłonna ekspozuje te kanały na odmiennie chwilowe stężenie jonów Ca^{2+} ? Czy syntetyczne aktywatory kanałów zwiększają wrażliwość kalmoduliny na jony Ca^{2+} , czy raczej wrażliwość kanałów na uwapnioną kalmodulinę?

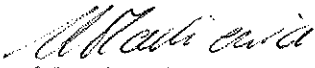
Z obowiązku recenzenta dodam, że na str. 5 opis sygnalizacji uruchamianej przez jony Ca^{2+} i kanał $K_{Ca3.1}$ wymagałby uściślenia. Mianowicie jony Ca^{2+} aktywują $K_{Ca3.1}$, wypływ jonów potasu ze śródbłonna aktywuje Na^+/K^+ -ATP-azę i $K_{IR2.1}$ i to powoduje hiperpolaryzację mięśniówki gładkiej odpowiednio przez wypływ jonów potasu przez $K_{IR2.1}$ i wypływ jonów sodu przez Na/K -ATP-azę. Na stronie 8 błędnie zacytowano pozycję literatury nr 46.

Reasumując, rozprawę doktorską mgr Moniki Kłoczy oceniam bardzo wysoko. Wyniki, które Doktorantka przedstawiła istotnie poszerzają wiedzę o mechanizmach rozkurczu naczyń oporowych w modelu nadciśnienia pierwotnego i wtórnego oraz o roli EDH i kanałów $K_{Ca3.1}$ i $K_{Ca2.x}$ i ich efektorów w tym procesie. Wyniki pracy mogą mieć potencjalne zastosowanie kliniczne i przyczynić się do skuteczniejszego leczenia chorych z nadciśnieniem tętniczym, szczególnie w stanach ostrego, nagłego nadciśnienia opornego na leczenie konwencjonalne (krótki czas działania SKA-31). Ważne jest to, że wyniki zostały już opublikowane w czasopiśmie o wysokim

współczynnika oddziaływania i dzięki ich dostępności stanowią ważny głos w dyskusji dotyczącej badanego zagadnienia.

Ostatecznie stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr Moniki Kłoczy spełnia wszystkie wymogi stawiane rozprawom na stopień doktora wymienione w art.13, ust. 1 i 2 Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65 poz. 595, z późn. zmianami). W związku z tym, z pełnym przekonaniem, zwracam się do Wysokiej Rady Naukowej Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku o dopuszczenie mgr Moniki Kłoczy do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie z uwagi na wysoką wartość rozprawy, fakt opublikowania wyników w prestiżowych czasopismach naukowych, doskonały warsztat metodyczny oraz uzyskanie wyników o potencjalnym znaczeniu klinicznym wnoszę wniosek o wyróżnienie rozprawy.

Dyrektor Szkoły Kształcenia Doktorantów – Dziekan
Centrum Medycznego Kształcenia Podyplomowego


dr hab. n. med. Urszula Mackiewicz, prof. CMKP