



Warszawa, 30 sierpnia 2018 r.

Dr hab. n. med. Urszula Mackiewicz, prof. nadzw. CMKP

OCENA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

mgr Olgi Karpińskiej

p.t. „Rola receptorów CB₁ i GPR55 w czynności skurczowo-rozkurczowej izolowanych tętnic płucnych człowieka i szczura”

wykonanej w Zakładzie Fizjologii i Patofizjologii Doświadczalnej
Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku

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

Stan napięcia naczyń krwionośnych decydujący o oporze naczyniowym i wielkości przepływu krwi w mikrokrażeniu jest regulowany w skomplikowany sposób przez liczne czynniki metaboliczne, chemiczne i mechaniczne o działaniu naczyniokurczącym i naczyniorozkurczowym. Czynniki te pozostając w dynamicznej równowadze decydują o chwilowym napięciu ściany naczyniowej. Zaburzenia tej równowagi inicjują lub zaostrzają przebieg wielu chorób sercowo-naczyniowych w tym nadciśnienia płucnego. W tętniczym nadciśnieniu płucnym pod wpływem nie do końca poznanego czynnika inicjującego dochodzi do przebudowy dystalnych tętnic płucnych, objawiającej się proliferacją i włóknieniem błony wewnętrznej, przerostem mięśniówki gładkiej, pogrubieniem przydanki oraz pojawieniem się zmian splotowych i zakrzepowych. W wyniku dysfunkcji wydzielniczej śródbłonna i przerostu mięśniówki gładkiej czynniki kurczące (endotelina, tromboksan) zyskują przewagę nad czynnikami rozkurczającymi takimi jak prostacyklina i NO. Podstawową metodą terapii jest leczenie celowane na tętniczki płucne (antagoniści kanału Ca²⁺, prostanoidy, antagoniści receptorów endoteliny i/lub inhibitory fosfodiesterazy typu 5). Pomimo postępów w leczeniu i łagodzeniu objawów choroby tętnicze nadciśnienie płucne jest nadal chorobą nieuleczalną, a dotyczy często ludzi młodych. Stąd, istnieje duża potrzeba poszukiwania nowych metod terapii. W tym celu niezbędne jest zrozumienie nadal niejasnego mechanizmu prowadzącego do zaburzenia równowagi skurczowo-rozkurczowej w ścianie naczynia. Ważnym elementem tego mechanizmu może być układ endokannabinoidowy, którego hipotensyjne działanie wykazano w krążeniu systemowym. Istnieją też nieliczne przesłanki o takim działaniu w krążeniu płucnym. Poszerzenie wiedzy na temat roli układu kannabinoidowego w krążeniu płucnym człowieka to cel nadrzędny rozprawy doktorskiej Pani mgr Olgi Karpińskiej.

Realizując to zadanie Doktorantka wyznaczyła sobie dwa cele szczegółowe. Po pierwsze, postanowiła zbadać czy pochodna kwasu arachidonowego, endokannabinoid 2-AG wykazujący powinowactwo do klasycznych receptorów kannabinoidowych oraz endogenny fosfolipid LPI, substancja „nie-kannabinoidowa”, będąca agonistą mało poznanego receptora GPR55, aktywowanego przez liczne ligandy kannabinoidowe, mają działanie naczyniorozszerzające w tętnicach płucnych człowieka. Po drugie, Doktorantka postanowiła sprawdzić czy endokannabinoidy w krążeniu płucnym są uwalniane w odpowiedzi na działanie czynników naczyniokurczących, stanowiąc tym samym element ujemnego sprzężenia zwrotnego, zabezpieczającego przed nadmiernym skurczem naczyń.

Pomimo tego, że stężenie 2-AG w krążeniu płucnym jest ok. 200 razy wyższe niż anandamidu, co sugeruje, że to właśnie ten endokannabinoid może odgrywać w naczyniach płucnych szczególnie ważną rolę, badania dotyczące roli 2-AG w tętnicach płucnych są fragmentaryczne, a u człowieka dotychczas ich nie przeprowadzono. Nie ma również żadnych danych dotyczących znaczenia osi LPI-GPR55 w krążeniu płucnym człowieka. Ważnym celem jest również sprawdzenie, czy układ endokannabinoidowy może być elementem precyzyjnego mechanizmu skurczowo-rozkurczowego ściany naczyniowej, ponieważ jego modulacja mogłaby być nową strategią leczenia chorób przebiegających ze wzrostem ciśnienia w tętnicach płucnych.

Reasumując oba cele rozprawy są nowatorskie, uzasadnione naukowo, prawidłowo sformułowane i dotyczą zagadnienia o ważnym znaczeniu poznawczym i potencjalnym znaczeniu klinicznym.

Ocena formalna rozprawy

Rozprawa doktorska Pani mgr Olgi Karpińskiej ma postać cyklu publikacji, na który składają się dwie prace oryginalne i 1 praca pogładowa. Wszystkie prace zostały opublikowane w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym, znajdujących się na liście A MNiSW. Współczynnik oddziaływania prac *Impact Factor* wynosi odpowiednio 2.982 2.936 i 2.405. Łączny *Impact Factor* cyklu publikacji wynosi **8.323**. Łączna punktacja MNiSW za powyższe prace to **80 pkt**. Prace zostały opublikowanych w latach 2017-2018. Pomimo bardzo krótkiego okresu, który upłynął od ich ukazania się były już cytowane 4 razy (wg. bazy *Web of Science*).

Rozprawa doktorska, którą stanowi cykl publikacji została wymieniona jako jedna z możliwych form pracy doktorskiej w art. 13 ust. 2 *Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65 poz. 595, z późn. zmianami)* i w mojej opinii jest najlepszą formą rozprawy doktorskiej przynajmniej z kilku powodów. Co najważniejsze, opublikowanie wyników w czasopiśmie o wysokim współczynniku oddziaływania pozwala środowisku naukowemu zapoznać się z nimi, a młodemu naukowcowi zaistnieć w dyskusji dotyczącej badanego zagadnienia, a także na wczesnym etapie pracy naukowej zdobyć umiejętności

niezbędne w procesie upowszechniania wyników swoich badań. Nie mniej ważny jest fakt, że praca doktorska przedstawiana w takiej formie recenzentom powołanym w przewodzie doktorskim, została już poddana krytycznej ocenie recenzentów czasopism naukowych. Finalnie przedstawione dzieło jest więc już skorygowane przez kilku ekspertów w danej dziedzinie, co niewątpliwie podnosi jakość osiągnięcia. Po trzecie, taka forma pracy doktorskiej jest też, w moim odczuciu, uczciwym wskazaniem trudu pozostałych współautorów, ponieważ w dzisiejszych realiach naukowych praca wykonana samodzielnie przez Doktoranta, wyłącznie pod opieką Promotora jest rzadkością. Na wskazanie wkładu pozostałych autorów nie pozwala klasyczna forma rozprawy. Należy podkreślić, że Doktorantka jest 1 autorem we wszystkich pracach, a w 2 z nich, co szczególnie godne podkreślenia jest autorem korespondującym. Pozostali współautorzy w oświadczeniach zgodnie stwierdzili, że udział mgr Olgi Karpińskiej w pracach oryginalnych wynosi co najmniej 60%, a w pracy poglądowej co najmniej 70%. W tym punkcie jedyne moje zastrzeżenie formalne budzi fakt, że poszczególni współautorzy opisując swój wkład pracy nie wskazali choćby orientacyjnie swojego procentowego udziału w pracy. Wydaje się, że z punktu widzenia każdego z autorów trudno jest ocenić procentowy udział doktoranta w publikacji. Taka ocena jest prawdopodobnie dostępna jedynie promotorowi pracy.

Cykl publikacji został uzupełniony krótkim opracowaniem zawierającym wprowadzenie do tematyki pracy, cel pracy, skrócony opis metod, krótką dyskusję najważniejszych wyników, wnioski oraz streszczenie w języku polskim i angielskim.

Cały przedstawiony mi do oceny materiał jest przygotowany nadzwyczaj starannie, omówienie napisane jest dobrym językiem, bez nadmiernych dłużyń i przedstawia wszystkie najważniejsze punkty rozprawy. Dobrą praktyką jest też moim zdaniem dołączenie do cyklu publikacji oryginalnych pracy poglądowej, ponieważ praca doktorska powinna zgodnie z Art.13 ust.1 wyżej wymienionej Ustawy „*wykazywać ogólną wiedzę teoretyczną kandydata w danej dyscyplinie naukowej*” co w przypadku cyklu publikacji wyłącznie oryginalnych nie zawsze jest dostateczne.

Podsumowując, bardzo wysoko oceniam wybór formy rozprawy jako cyklu publikacji oraz fakt, że we wszystkich pracach Doktorantka jest pierwszym autorem, a w dwóch z nich autorem korespondencyjnym.

Ocena merytoryczna rozprawy

Przedmiotem badań w przedstawionej mi do oceny rozprawie były izolowane tętnice płucne człowieka pobrane od 56 pacjentów, w tym od 41 mężczyzn i od 15 kobiet oraz tętnice płucne pobrane od szczurów Rasy Wistar, płci męskiej. Materiał ludzki pochodził z marginesu zdrowej tkanki, otrzymanej śródoperacyjnie od chorych operowanych z powodu niedrobnokomórkowego raka płuc. Chorzy nie mieli dysfunkcji prawej i lewej komory oraz wykluczono u nich nadciśnienie płucne. Stan napięcia naczyń był mierzony przy pomocy miografu. Czynność skurczową

izolowanych naczyń badano przy pomocy agonistów receptorów sprzężonych z białkiem $G_{q/11}$: angiotensyny II, analogu tromboksanu, fenylefryny i serotoniny. Czynność rozkurczową pod wpływem 2-AG Doktorantka badała w naczyniach skurczonych pierwotnie za pomocą analogu tromboksanu i angiotensyny II, a czynność rozkurczową LPI w naczyniach skurczonych za pomocą fenylefryny.

Do zbadania mechanizmu działania rozkurczowego 2-AG i LPI wykorzystwała szereg substancji blokujących wybiórczo receptory CB_1 , CB_2 , GPR55, PPAR- γ , inhibitory biosyntezy i rozkładu kannabinoidów, a także substancje mogące potwierdzić lub wykluczyć działanie 2-AG i LPI poprzez NO i wapnionależne kanały potasowe. Dodatkowo Doktorantka wykorzystwała znane metody biochemiczne (RT-PCR, Western Blot, immunohistochemia) w celu zbadania ekspresji receptorów na poziomie mRNA i białka, a także wskazania ich lokalizacji w naczyniach.

Należy podkreślić, że Doktorantka pracuje w Zespole o ogromnym doświadczeniu w badaniu izolowanych naczyń, zarówno pobranych od ludzi jak i szczurów. **Metodyka badań nie budzi żadnych wątpliwości.** Jest przemyślana i starannie opisana. W każdej grupie przebadano co najmniej 6-8 naczyń. Przed właściwym badaniem sprawdzono reaktywność naczyń, prawidłową funkcję śródbłonna, dla każdej badanej substancji zbadano wpływ nośnika, w którym znajdowała się testowana substancja w naczyniu pochodzącym o tego samego pacjenta. **Na szczególne uznanie zasługuje pozyskanie bardzo cennego materiału ludzkiego i dobór metod pozwalający, nie tylko zbadać samo zjawisko rozkurczowego działania 2-AG i LPI, ale także umożliwiający wgląd w mechanizmy tego działania.** Tylko takie prace, w których poszukuje się mechanizmów, nie poprzestając na samym opisie zjawiska, mają szansę zostać opublikowane w dobrych czasopismach, co udało się osiągnąć Doktorantce.

Główne wyniki uzyskane przez Doktorantkę zawarte w dwóch publikacjach oryginalnych pozwoliły ustalić, że:

- 2-AG podany egzogennie nie ma wpływu na napięcie spoczynkowe izolowanych tętnic płucnych człowieka. Prowadzi natomiast do rozkurczu naczyń poddanych uprzednio działaniu czynnika kurczącego, aktywującego receptory sprzężone z białkiem $G_{q/11}$, działając głównie przez receptory kannabinoidowe CB_1 . Efekt ten występuje tylko w obecności śródbłonna.
- Antagonista receptora CB_1 oraz inhibitor biosyntezy 2-AG nasilają kurczące działanie tromboksanu, podczas gdy inhibitor rozkładu 2-AG zmniejsza to działanie, co sugeruje endogenną produkcję 2-AG w tętnicach płucnych i jego ochronne działanie zabezpieczające przed nadmiernym skurczem naczyń.
- Głównym enzymem rozkładającym 2-AG w naczyniach płucnych jest lipaza monoacyloglicerolowa (MAGL), a nie hydrolaza amidowa kwasów tłuszczowych (FAAH).

- 2-AG jest najsilniej działającym endokannabinoidem w krążeniu płucnym, o silniejszym niż inne kannabinoidy działaniu naczyniorozszerzającym.
- LPI podany egzogennie prowadzi do rozkurczu izolowanych tętnic płucnych człowieka działając na receptory GPR55, PPAR- γ i śródbłonkowe receptory dla kannbinoidów – CBe.
- Efekt działania LPI jest zależny od śródbłonka i związany z syntezą NO oraz aktywacją wszystkich podtypów kanałów potasowych aktywowanych jonami Ca^{2+} . Doktorantka ponadto po raz pierwszy udowodniła ekspresję genu GPR55 na poziome mRNA i białka w tętnicach płucnych człowieka.

Uzyskane przez Doktorantkę wyniki są nowatorskie, istotnie poszerzają wiedzę na temat układu kannabinoidowego w krążeniu płucnym człowieka, i co najważniejsza wskazują na kilka potencjalnie ważnych celów terapeutycznych w leczeniu tętniczego nadciśnienia płucnego takich jak receptor CB_1 , receptor GPR55, PPAR- γ , MAGL i kanały potasowe aktywowane przez Ca^{2+} .

Doktorantka na podstawie uzyskanych wyników sformułowała 5 wniosków. W moim odczuciu wnioski nr 1 i 2 powinny być uzupełnione o stwierdzenie, że 2-AG i LPI rozkurczają naczynia wstępnie skurczone i efekt ten występuje, gdy substancje są podane egzogennie. Pozostałe wnioski są sformułowane prawidłowo i odpowiadają celom rozprawy.

W trakcie lektury rozprawy nasunęło mi się kilka pytań:

- W świetle zaproponowanego przez Doktorantkę mechanizmu, 2-AG jest syntetyzowany w komórkach śródbłonka i ewentualnie w mięśniówce gładkiej w sposób zależny od wzrostu stężenia jonów Ca^{2+} pod wpływem substancji kurczących działających na receptory związane z białkiem $\text{G}_{q/11}$. Dlaczego więc naczynia skurczone za pośrednictwem analogu tromboksanu, który jest silnym stymulatorem wzrostu stężenia Ca^{2+} , naczynie nie rozkurcza się pod wpływem endogennie produkowanego 2-AG, a rozkurcz wymaga podania tego kannabinoidu egzogennie? Czy zdaniem Doktorantki naczynie rozkurczyłoby się pod wpływem endogennie wyprodukowanego 2-AG w obecności inhibitora rozkładu 2-AG - MAGL?
- Dlaczego Doktorantka badając mechanizm skurczowo-rozkurczowy tętnic płucnych w kontekście tętniczego nadciśnienia płucnego nie użyła jako czynnika kurczącego naczynia endoteliny-1, która ma udokumentowane znaczenie w tej jednostce chorobowej (blokery receptorów endotelinowych łagodzą objawy choroby i poprawiają rokowanie chorych).
- Bardzo interesującą i niewyjaśnioną ostatecznie kwestią jest fakt, że tętnicze nadciśnienie płucne występuje znacznie częściej u kobiet niż u mężczyzn. Według niektórych rejestrów (*REVEAL Registry*) kobiety stanowią nawet ok. 80% wszystkich chorych. Z drugiej strony w modelach eksperymentalnych tętniczego nadciśnienia płucnego u zwierząt samice są mniej podatne na indukcję nadciśnienia przez hipoksję lub monokrotalinę. To ochronne działanie jest znoszone przez owariektomię. W tym kontekście mówi się o tzw. „paradoksie estrogenowym” i zaburzeniach metabolizmu estrogenowego u chorujących kobiet. Nie można wykluczyć jednak zależnej od płci

odmiennej reakcji naczyń na czynniki kurczące i rozkurczowe. Doktorantka dysponowała materiałem głównie pochodzącym od mężczyzn, ale była w posiadaniu również tętnic płucnych od 15 kobiet. Być może odrębna dla obu płci analiza uzyskanych wyników ujawniałaby pewne zależne od płci różnice, w mechanizmach kurczących i rozkurczających naczynia, w tym w układzie endokannabinoidowym. Co prawda, we wcześniejszych pracach nie wykazano zależnego od płci wpływu anandamidu na tętnice płucne. Nie wyklucza to jednak istnienia takich różnic dla osi 2-AG-CB₁ i LPI-GPR55, które wydają się odgrywać ważną rolę w krążeniu płucnym. Czy na podstawie dostępnego materiału udałoby się ustalić, czy ekspresja i lokalizacja receptorów CB₁ i GPR55 w tętnicach płucnych jest zależna od płci? Ciekawym byłoby również przeprowadzenie badań układu kannabinoidowego u samic szczurów z zachowanym cyklem hormonalnym i po ovariectomii.

Reasumując, rozprawę doktorską mgr Olgi Karpińskiej oceniam bardzo wysoko. Wyniki, które przedstawiła są nowatorskie, poszerzają istotnie wiedzę o układzie kannabinoidowym w krążeniu płucnym człowieka i jego potencjalnej roli w regulacji napięcia ścian naczyń. Badania zawierają udaną próbę poszukiwania mechanizmów, a nie są tylko opisem zjawisk. Wyniki pracy mogą mieć potencjalne zastosowanie kliniczne i przyczynić się do skutecznego leczenia chorych z nadciśnieniem płucnym. Niezmiernie ważne jest to, że wyniki zostały już opublikowane w czasopiśmie o wysokim współczynniku oddziaływania i dzięki ich dostępności stanowią ważny głos w dyskusji dotyczącej badanego zagadnienia.

Ostatecznie stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr Olgi Karpińskiej 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 Olgi Karpińskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

Jednocześnie z uwagi na wysoką wartość rozprawy, fakt opublikowania wyników w prestiżowych czasopiśmie naukowych, nowatorstwo badań, doskonały warsztat metodyczny, unikalny materiał badawczy oraz uzyskanie wyników o potencjalnym znaczeniu klinicznym, oraz w związku ze spełnieniem kryteriów wyróżniania prac doktorskich ustalonych przez Organy Uczelni **wnoszę do Wysokiej Rady Naukowej Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku wniosek o wyróżnienie rozprawy.**

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

Kierownik Studium Studiów Doktoranckich
Centrum Medycznego Kształcenia Podyplomowego


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