

Ocena rozprawy doktorskiej

"Rola receptorów CB1 i GPR55 w czynności skurczowo-rozkurczowej izolowanych tętnic płucnych człowieka i szczura"

wykonanej przez mgr Olę Karpińską

**na Wydziale Farmaceutycznym z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej
Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku**



**UNIWERSYTET
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE**

Patofizjologia nadciśnienia płucnego (NP) obejmuje wiele stanów klinicznych, które stanowią powikłanie większości chorób układu sercowo-naczyniowego i układu oddechowego. Zgodnie z wytycznymi Europejskiego Towarzystwa Kardiologicznego (ESC) i Europejskiego Towarzystwa Oddechowego (ERS) do spraw rozpoznawania i leczenia nadciśnienia płucnego, nadciśnienie płucne definiuje się jako podwyższenie średniego ciśnienia w tętnicy płucnej (PAPm) ≥ 25 mm Hg w spoczynku, oznaczone za pomocą cewnikowania prawego serca (RHC). Ta zgrubna definicja PH wymaga dodatkowej charakterystyki w oparciu o hemodynamiczne i patofizjologiczne podłoże choroby. Co za tym idzie, złożone przyczyny NP, związane na przykład z podłożem tętniczym, komorowym, zatorowym lub niedotlenieniem na skutek choroby płuc, wymagają osobnego postępowania diagnostycznego i terapeutycznego. Do schematu leczenia NP, oprócz antagonistów wapnia i receptorów endoteliny, włącza się prostanoidy oraz jako alternatywne strategie leczenia, włącza się na przykład inhibitory kinazy tyrozynowej czy bezpośrednie stymulatory cyklazy guanylowej. NP jest chorobą nieuleczalną, przy zachowanej reaktywności naczyń płucnych 95% chorych przeżywa 5 lat, co stanowi ogromną poprawę wskaźników w ostatnich 20 latach. Nie mniej, jest to choroba nieuleczalna, a jedyna skuteczna terapia jaką jest przeszczep płuc, jest wskazana u pacjentów, którzy nie odpowiadają na intensywne celowane leczenie farmakologiczne. Wciąż, zatem istnieje potrzeba coraz to lepszej i skuteczniejszej farmakoterapii nadciśnienia płucnego.

Kluczową rolę w naczynioskurczowym mechanizmie tętniczego NP odgrywają komórki mięśniówki naczyń. Ich rola wiąże się zarówno z aktywnością skurczową jak i

Instytut Fizyki
im. Mariana Smoluchowskiego

Zakład Fizyki Medycznej

Kierownik Zakładu

Ewa Łucja Stępień
dr hab. n. med. prof. UJ
e-mail: e.stepien@uj.edu.pl

tel. sekr. 12 664 46 40
bezp. 12 664 47 62
ul. Łojasiewicza 11
30-348 Kraków

przebudową naczyń (rozrost mięśniówki). Dlatego jednym z głównych celów terapii NP jest zapewnienia efektu naczyniorozszerzającego.

Endogeni agoniści receptorów kannaboidowych (endokannaboidy), a głównie znany od 1992 roku anandamid (AEA), lub odkryty 3 lata później 2-arachidynolglicerol (2AG), są najlepiej poznanymi i najczęściej badanymi ednokannaboidami. Związki te charakteryzują się typowym 3-fazowym efektem na układ krążenia, z czego ostatnia, najdłuższa hipotensyjna faza jest przedmiotem badań nad NP. Niewątpliwie faza ta jest związana z pobudzeniem receptorów kannabinoidowych CB1 i CB2. Inny niż receptory CB1/CB2, na przykład badany receptor GPR55, który jest pobudzany przez agonistę L- α -lizofosfatydyloinozytol (LPI) i ma działanie rozkurczowe, wywołując zależny od śródbłonna (endokannaboidy) efekt naczyniorozszerzający. Mimo, że receptory GRP55 nie wykazują podobieństwa strukturalnego do klasycznych receptorów CB1/CB2 (są sprzężone z białkiem G), to mogą być zaliczane do rodziny receptorów kannaboidowych. Nie jasne było do tej pory, czy 2-AG ma działanie osłabiające skurcz tętnic płucnych, czy wręcz przeciwnie (sprzeczne dane). Jaki jest mechanizm działania 2-AE w tętnicach płucnych? Nie jasny również był do tej pory związek między pobudzeniem receptorów sprzężonych z białkiem $G_{q/11}$ a naczyniorozszerzającym działaniem endokannaboidów. Powyższe spostrzeżenia stały się podstawą do sformułowania przez Doktorantkę założeń rozprawy doktorskiej.

Praca została wykonana pod kierunkiem promotora **dr hab. n. med. Hanny Kozłowskiej**, uznanego specjalisty z zakresu fizjologii i patofizjologii, oraz promotora pomocniczego **dr n. farm. Marty Baranowskiej-Kuczko**.

Celem rozprawy doktorskiej było zbadanie działania rozkurczowego 2-AG przez receptory CB1 oraz osi GPR55-LPI w izolowanych tętnicach płucnych człowieka, a także ocena potencjalnie ochronnego wpływu endokannaboidów na kurczące się izolowane tętnice płucne szczura i człowieka.



UNIWERSYTET
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

Instytut Fizyki
im. Mariana Smoluchowskiego

Zakład Fizyki Medycznej

Kierownik Zakładu

Ewa Łucja Stępień
dr hab. n. med. prof. UJ
e-mail: e.stepien@uj.edu.pl

tel. sekr. 12 664 46 40
bezp. 12 664 47 62
ul. Łojasiewicza 11
30-348 Kraków



UNIwersytet
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

Aby zrealizować tak wyznaczone cele, doktorantka podjęła się badań na izolowanych tętnicach człowieka, pozyskanych od pacjentów operowanych z powodu niedrobnokomórkowego raka płuca oraz od szczurów rasy Wistar, z zachowanym lub usuniętym śródbłonkiem naczyń. Badania odbyły się na podstawie zgód komisji bioetycznych odpowiednio dla badań na zwierzętach i na pacjentach, wydanych przez komisję bioetyczną Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku. Wyniki przeprowadzonych eksperymentów zostały opublikowane w 2 artykułach oryginalnych:

1. **Karpińska O**, Baranowska-Kuczko M, Kloza M, Ambroz Ewicz E, Kozłowski T, Kasacka I, Malinowska B, Kozłowska H. Activation of CB(1) receptors by 2-arachidonoylglycerol attenuates vasoconstriction induced by U46619 and angiotensin II in human and rat pulmonary arteries. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2017;312(6):R883-R893. doi: 10.1152/ajpregu.00324.2016.
2. **Karpińska O**, Baranowska-Kuczko M, Malinowska B, Kloza M, Kusaczuk M, Gęgotek A, Golec P, Kasacka I, Kozłowska H. Mechanisms of I-alpha-lysophosphatidylinositol-induced relaxation in human pulmonary arteries. *Life Sci.* 2018;192:38-45. doi: 10.1016/j.lfs.2017.11.020.

Aktualny stan wiedzy na temat modulowania właściwości naczynioskurczowych receptorów $G_{q/11}$ przez endokannabinoidy na drodze negatywnego sprzężenia zwrotnego, poparty rozszerzoną dyskusją, ukazał się w dołączonym artykule przeglądowym:

3. **Karpińska O**, Baranowska-Kuczko M, Kloza M, Kozłowska H. Endocannabinoids modulate $G(q/11)$ protein-coupled receptor agonist-induced vasoconstriction via a negative feedback mechanism. *J Pharm Pharmacol.* 2018;70(2):214-222. doi:10.1111/jphp.12854.

Do załączonych artykuły zostały przedstawione zgody odpowiednio wszystkich współautorów zaświadczające, że udział Doktorantki **mgr Olgi Karpińskiej** w 2 publikacjach doświadczalnych wynosił co najmniej 60%, a w publikacji przeglądowej co najmniej 70%. Doktorantka była pierwszym autorem dla wszystkich artykułów i autorem korespondencyjnym dla 2 i 3 trzeciego artykułu.

Zbiór artykułów poprzedza Rozdział I zatytułowany *Wstęp*, w którym Doktorantka jasno wprowadza w zagadnienia dotyczące prawdopodobnej roli naczyniorozszerzającej endokannabinoidów na tętnice płucne - badania na tętnicach płucnych nie były do tej pory publikowane. W tej części pracy Doktorantka umieściła uproszczony schemat interakcji receptorów sprzężonych z białkiem $G_{q/11}$ i receptorów kannaboidowych (Rycina 1), zaczerpnięty z pracy przeglądowej [3] i zmodyfikowany, który jest kluczowy dla zrozumienia złożenia rozprawy doktorskiej. Następnie w Rozdziale

Instytut Fizyki
im. Mariana Smoluchowskiego

Zakład Fizyki Medycznej

Kierownik Zakładu

Ewa Łucja Stępień
dr hab. n. med. prof. UJ
e-mail: e.stepien@uj.edu.pl

tel. sekr. 12 664 46 40
bezp. 12 664 47 62
ul. Łojasiewicza 11
30-348 Kraków

II zawarte zostały *Cele pracy*. Cele pracy sformułowane zostały jasno i odwołują się do celów postawiony w publikacjach doświadczalnych włączony jako podstawę do pracy doktorskiej [1,2] (Rozdziały IV i V).

Rozdział III obejmuje *Materiały i metody*, zwięźle opisane i odwołujące się do Rozdziałów IV i V zawierających w/w publikacje doświadczalne. Wybrana przez Doktorantkę metodyka badawcza jest odpowiednia do realizacji zamierzonych przez siebie celów. Ocena funkcjonalności czynności skurczowo—rozkurczowej izolowanych naczyń została wykonana z wykorzystaniem kąpieli tkankowej i miografu drutowego. Na podkreślenie zasługuje fakt wybór jako modelu eksplantów podsegmentarnych tętnic płucnych pozyskanych śródoperacyjnie od pacjentów poddawanych zabiegom pneumotomii lub lobektomii. Jest to materiał unikalny i jak najbardziej reprezentatywny do realizacji zamierzonych celów badawczych. Model zwierzęcy stanowiły izolowane tętnice płucne szczura. Do badań właściwości modulujących działanie naczyniorozkurczowe 2-AG oraz LPI użyto ligandów receptorów CB1 (AM251), CB2 (AM630) i GPR55 (CID16020046), a także inhibitorów biosyntezy i rozkładu 2-AG i AEA (odpowiednio: RHC80267, JZL184, URB597), inhibitora syntazy tlentu azotu (L-NAME) oraz cykloksygenazy (indometacyna), ponadto blokerów kanałów potasowych o małym, średnim i dużym przewodnictwie dla jonów potasu oraz blokera receptorów PPAR- γ . Doświadczenia wykonano metodą kumulacyjną, co pozwoliło na wyznaczenie parametrów kinetycznych (farmakologicznych) takich jak siłę działania agonisty (pEC_{50} i pEC_{25}), powinowactwo agonisty do receptora i maksymalny efekt agonisty (R_{max}). Metody analizy statystycznej wyników zostały dobrane prawidłowo, liczba pacjentów wynosiła (od 6 do 8), co pozwoliło wyliczyć wartości średnie i SEM. Ponadto Doktorantka zastosowała metody molekularne (PCR, Western blott) do oceny ekspresji receptorów GPR55 w homogenatach naczyń płucnych i oskrzelików człowieka, oraz ekspresji receptorów CB1 i CB2 w homogenatach izolowanych tętnic płucnych szczura i człowieka. Te dwie metody uzupełniają się do oceny ekspresji białek, szczególnie w przypadkach



UNIwersytet
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

Instytut Fizyki
im. Mariana Smoluchowskiego

Zakład Fizyki Medycznej

Kierownik Zakładu

Ewa Łucja Stępień
dr hab. n. med. prof. UJ
e-mail: e.stepien@uj.edu.pl

tel. sekr. 12 664 46 40
bezp. 12 664 47 62
ul. Łojasiewicza 11
30-348 Kraków

gdy przewidywany jest mechanizm epigenetyczny regulacji ekspresji receptorów. Tego nie można wykluczyć w sytuacji klinicznej jaką jest NP, gdzie *hipoksja* jest jednym z krytycznych i decydujących czynników na rozwój NP oraz determinuje efektywność leczenia.

Najmocniejszą stroną rozprawy doktorskiej są uzyskane wyniki zawarte w Rozdziałach IV i V (publikacje [1,2]). Doktorantka w swojej rozprawie po raz pierwszy zaprezentowała zależne od śródbłonna i zachodzące za pośrednictwem receptorów CB1 i GPR55 rozkurczowe działanie 2-AG i LPI w układzie izolowanych fragmentów tętnic płucnych człowieka. Wyniki swoich badań Doktorantka zwięźle zawarła w Tabeli 2 w Rozdziale VII *Dyskusja*, która idealnie podsumowuje wyniki prac z Rozdziałów IV i V [1,2]. Tabela pokazuje mechanizm działania modulującego endokannabinoidu 2-AG oraz niekannabinoidowego związku LPI na indukowaną kurczliwość tętnic płucnych człowieka, pokazując udział CB1/CB2 (dla 2-AG) oraz śródbłonkowo-zależny mechanizm osi GPR55-LPI.

Coraz lepsza znajomość patomechanizmów odpowiedzialnych za rozwój NP umożliwia optymalizację dotychczasowej farmakoterapii. Jednym z kierunków takiej optymalizacji jest poszukiwanie nowych substancji w grupach farmakologicznych nie stosowanych do tej pory w ramach terapii celowanej NP. Rozprawa doktorska p. **mgr Olgi Karpińskiej** stanowi znaczący przyczynek do wskazania nowej grupy substancji działających na receptory endokannabinoidowe (2-AG) oraz innych nie-kannabinoidowych, substancji takich jak LPI, działających na receptory z grupy $G_{q/11}$ jako potencjalne nowe związki aktywne wspomagające leczenie objawów NP.

Czego brakuje w omówieniu artykułów włączonych do rozprawy doktorskiej, to dyskusji nad potencjalną rolą czynników środowiskowych, takich jak hipoksja, w patomechanizmie rozwoju NP, a tym samym w modulacji właściwości naczyniorozkurczowej w/w związków w realnej sytuacji klinicznej. Hipoksja przyczynia się do rozwoju szeregu powikłań towarzyszących NP, takich jak stenoza naczyń



UNIwersYTET
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

Instytut Fizyki
im. Mariana Smoluchowskiego

Zakład Fizyki Medycznej

Kierownik Zakładu

Ewa Łucja Stępień
dr hab. n. med. prof. UJ
e-mail: e.stepien@uj.edu.pl

tel. sekr. 12 664 46 40
bezp. 12 664 47 62
ul. Łojasiewicza 11
30-348 Kraków



UNIWERSYTET
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

spowodowana proliferacją komórek mięśniówki, zwłóknienie itp. Ostatnie badania wskazują, że hipoksja wzmacnia metabolizm kwasu arachidonowego (AA) i zależnych od AA eikozanoidów. Może badania lipidomiczne dałyby nowy wgląd w ten mechanizm? Kolejną sugestią jest głębsza analiza komunikacji między komórkami śródbłonna a komórkami mięśniówko tętnic. Skoro śródbłonek jest kluczowy w modulacji odpowiedzi na LPI, poprzez działanie endokannabinoidów, to w jaki sposób endokannabinoidy śródbłonkowe (np. 2-AG) są transportowane do komórek mięśni naczyń? Czy mogą tu odgrywać rolę mikropęcherzyki pochodzenia śródbłonkowego? Tak postawione pytanie może okazać się nowym wyzwaniem dla dalszych badań.

Struktura i opracowanie edytorski pracy są wzorowe. Drobne uwagi dotyczą języka anielskiego w podsumowaniu (*Summary*): brak gdzieniegdzie przedimków, semantyczne nadużycia słowa „*weakened*” zamiast „*impaired*”.

Na koniec, co jest warte podkreślenia, Doktorantka umieściła spis dorobku własnego, który obejmuje oprócz wymienionych 3 publikacji stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej, kolejne 2 publikacje w czasopismach ze współczynnikiem oddziaływania 3,718 (*Vascul Pharmacol*), 3,144 (*J Funct Foods*) oraz jedną ze współczynnikiem 2,936 (*Life Sci*), z tematyki badawczej zbliżonej do tematyki rozprawy doktorskiej. Ponadto lista doniesień zjazdowych, która obejmuje 16 pozycji, z których zdecydowana większość stanowią doniesienia z konferencji międzynarodowych opublikowane w recenzowanych suplementach zjazdowych takich jak *Cardiovasc Res*, *J Physiol Pharmacol*. Do indywidualnych osiągnięć doktorantki należy wliczyć I. miejsce za ustną prezentację podczas *10th Białystok International Medical Congress for Young Scientists* w 2015 roku oraz szczególne osiągnięcie jakim jest nagroda za najlepszy plakat na konferencji „*Pharmacological aspects of microvascular cel-cell signalling and CVS diseases*” *British Pharmacological Society* Oxford 2016.

Instytut Fizyki
im. Mariana Smoluchowskiego

Zakład Fizyki Medycznej

Kierownik Zakładu

Ewa Łucja Stępień
dr hab. n. med. prof. UJ
e-mail: e.stepien@uj.edu.pl

tel. sekr. 12 664 46 40
bezp. 12 664 47 62
ul. Łojasiewicza 11
30-348 Kraków

Ponadto Doktorantka jest beneficjentką grantu PRELUDIUM z NCN zat. „Kompleksowa ocena potencjalnie protekcyjnego działania kannabidiolu w doświadczalnym modelu tętniczego nadciśnienia płucnego”.

Podsumowując moją ocenę stwierdzam, że rozprawa stanowi cykl wartościowych i nowatorskich publikacji naukowych z zakresu fizjologii i farmakologii nadciśnienia płucnego. Opisanie mechanizmu działania 2 osi pobudzenia receptorów CB1 i GPR55 w czynnościowym, zależnym od śródbłonna, mechanizmie rozkurczu tętnic płucnych człowieka wskazuje na ważną rolę układu *endokanabioidowego* w tym procesie, ale także daje podstawę do wprowadzenia nowych związków o działaniu na receptory CB1 do terapii nadciśnienia płucnego.

W związku z powyższym, zwracam się do Wysokiej Rady Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku z wnioskiem o dopuszczenie Pani **mgr Olgi Karpińskiej** do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ponadto wnioskuję do Wysokiej Rady o przyznanie wyróżnienia przedłożonej mi do oceny rozprawie doktorskiej Pani **mgr Olgi Karpińskiej**. Na wyróżnienie zasługuje bardzo wysoki poziom badań z zakresu fizjologii i farmakologii, a przede wszystkim nowatorstwo uzyskanych wyników badań.



UNIwersytet
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

Instytut Fizyki
im. Mariana Smoluchowskiego

Zakład Fizyki Medycznej

Kierownik Zakładu

Ewa Łucja Stępień
dr hab. n. med. prof. UJ
e-mail: e.stepien@uj.edu.pl

tel. sekr. 12 664 46 40
bezp. 12 664 47 62
ul. Łojasiewicza 11
30-348 Kraków

dr hab. prof. UJ Ewa Łucja Stępień