



WARSZAWSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY MEDICAL UNIVERSITY OF WARSAW

Zakład Farmakodynamiki

Dr hab. n. farm. Magdalena Bujalska-Zadrozny
Zakład Farmakodynamiki
Warszawski Uniwersytet Medyczny
Ul. Banacha 1b
02-097 Warszawa

Warszawa, 25.08.2018r.

RECENZJA

Rozprawy na stopień doktora nauk farmaceutycznych Pana mgr Marka Toczka pt. „Farmakologiczna ocena wybranych elementów układu endokannabinoidowego jako potencjalnych punktów uchwytu terapii hipotensyjnej w doświadczalnym modelu nadciśnienia DOCA-salt” wykonanej w Zakładzie Fizjologii i Patofizjologii Doświadczalnej Uniwersytetu Medycznego W Białymstoku, pod kierunkiem Pani Prof. dr hab. n. med. Barbary Malinowskiej.

Zarówno rozpowszechnione występowanie jak i problem skutecznego leczenia nadciśnienia tętniczego (NT) stanowi jedno z podstawowych wyzwań stojących przed współczesną medycyną. Średnia częstość występowania NT na świecie w 2015 roku wyniosła aż 24,1% u mężczyzn i 20,1% u kobiet [Prejbisz et al. 2017]. W opublikowanej w 2016r. analizie badania epidemiologicznego PolSenior częstość występowania NT u osób w wieku ≥ 65 lat wynosiła aż 60–83% [Zdrojewski et al. 2016]. Zatem jak widać ryzyko zachorowania na NT jest znaczne i prawdopodobnie będzie się zwiększać wraz ze starzeniem się populacji.

Mimo nieznajomości indywidualnych przyczyn rozwoju NT u większości leczonych, solidnie udokumentowane są korzyści z powszechnego i poprawnie prowadzonego leczenia farmakologicznego.

Ze względu na wielość możliwych przyczyn pierwotnego NT, konieczne jest poszukiwanie kolejnych środków farmakologicznych obniżających ciśnienie tętnicze. Dotyczy to także substancji mających punkt uchwytu w tych układach biochemicznych ustroju, które uprzednio nie były brane pod uwagę jako cele terapeutyczne w leczeniu NT. W ten nurt wpisuje się recenzowana praca pana Marka Toczka, oceniająca wybrane elementy układu endokannabinoidowego (ECS) pod kątem przydatności jako potencjalnych punktów uchwytu leczenia hipotensyjnego. W świetle wzrastającej w ostatnich latach wiedzy nt. tego układu i jego udziału w różnych procesach ustrojowych istotnych z punktu widzenia leczenia różnych chorób i objawów, uważam prezentowane podejście badawcze za ważne i aktualne.

Rozprawa doktorska Pana Marka Toczka obejmuje 49 stron maszynopisu; w tekst maszynopisu włączono ponadto odbitki trzech prac - dwóch oryginalnych i jednej przeglądowej stanowiących podstawę recenzowanej rozprawy doktorskiej.

W rozprawie zachowano po części tradycyjne elementy opisu, umożliwiające łatwy dostęp do pożądanych informacji.

Rozpoczynając właściwy tekst pracy, **wprowadzenie** Doktorant poświęcił przede wszystkim problemowi nadciśnienia. Rozdział ten skupia się na przeanalizowaniu patomechanizmu jego powstawania, ze szczególnym wskazaniem na znaczenie nadmiernej aktywności układu współczulnego, oraz na możliwości obwodowej modulacji czynności układu współczulnego na poziomie zakończeń współczulnych poprzez receptory presynaptyczne CB1. Z założeń tych wynika także przedstawione tu omówienie znaczenia ECS w regulacji czynności układu krążenia; wzmożenie napięcia tego układu (naturalnie uruchamiane w stanach hipertensji) ma generalnie obniżać ciśnienie tętnicze. W uproszczeniu wynika stąd, że potencjalny efekt przeciwnadciśnieniowy można osiągnąć albo (1) hamując metabolizm jednego z głównych endogennych kannabinoidów - anandamidu (AEA) przez podanie inhibitora hydrolazy amidowej kwasów tłuszczowych (FAAH) albo (2) pobudzając bezpośrednio receptory presynaptyczne CB1 zlokalizowane na zakończeniach przed- i/lub zwojowych włókien współczulnych zaopatrujących naczynia, zwłaszcza tętnicze o charakterze oporowym. Zasygnalizowano także fakt, że poszczególne elementy ECS oraz mechanizmy zaangażowane w patogenezę nadciśnienia tętniczego mogą podlegać zmianom zależnym od wieku. Wprowadzenie w pełni uzasadnia tematykę badań opisanych we włączonych do doktoratu pracach.

Cel pracy, którym była farmakologiczna ocena wybranych elementów ECS jako potencjalnych punktów uchwytu terapii hipotensyjnej w modelu nadciśnienia DOCA-salt u szczura jest dobrze sformułowany. W celu realizacji założeń pracy Autor przeprowadził złożone badania składające się na dwie wymienione prace eksperymentalne, stanowiące kolejne części rozprawy.

W publikacji nr 1 (tytuł: **"Age-specific influences of chronic administration of the fatty acid amide hydrolase inhibitor URB597 on cardiovascular parameters and organ hypertrophy in DOCA-salt hypertensive rats"**), wychodząc z założenia, że aktywność układu endokannabinoidowego ulega zwiększeniu w przebiegu nadciśnienia, a FAAH jest głównym enzymem hydrolizującym jeden z dwóch podstawowych endokannabinoidów ustrojowych, czyli anandamidu, Doktorant badał wpływ dwutygodniowego podawania inhibitora FAAH (związek URB597) na ciśnienie krwi, częstość pracy serca (HR) oraz przerost serca i nerek u szczurów z nadciśnieniem uzyskanym w modelu DOCA-salt w dwóch krytycznych okresach rozwoju tego nadciśnienia. Uzyskał przez to nie tylko odpowiedź na pytanie, czy wzrost aktywności ECS spowodowany zahamowaniem FAAH wpłynie obniżająco na ciśnienie krwi, ale i na ile efekt ten jest zależny od wieku zwierząt. Doświadczenia przeprowadzono w związku z powyższym na dwóch grupach wiekowych zwierząt poddanych jednostronnej nefrektomii w modelu DOCA-salt oraz na zwierzętach z prawidłowym ciśnieniem tętniczym (także poddanych jednostronnej nefrektomii). Autor wnioskuje, że dwutygodniowe podawanie URB597 szczurom z nadciśnieniem w modelu DOCA-salt powoduje zależne od wieku obniżenie ciśnienia krwi, częstości pracy serca oraz (również zależne od wieku) zmniejszenie przerostu serca i nerek oraz pozostaje bez wpływu na masę ciała, spożycie pokarmu i wody. Bardziej ogólny wniosek jest taki, że należy zachować ostrożność i bardzo wnikliwie interpretować wyniki badań inhibitorów FAAH ze względu na ich potencjalną zależność uzyskiwanych efektów od wieku zwierząt i zastosowanego modelu doświadczalnego.

Nasuwa się pytanie, dlaczego w badaniach nie porównano efektu działania inhibitora FAAH do związku odniesienia tzw. kontroli pozytywnej?

W pracy tej na wyraźną pochwałę zasługuje konstrukcja schematu badań uwzględniająca nie tylko sam potencjalny wpływ hamowania metabolizmu endogenego anandamidu, ale i przemyślane wprowadzenie pewnych elementów badań uwzględniających znane z wcześniejszych publikacji innych autorów różnice w zakresie mechanizmów odpowiedzialnych za utrzymywanie nadciśnienia tętniczego na krytycznych etapach rozwojowych zwierząt w modelu DOCA-salt.

Doświadczenia zawarte w **pracy nr 2** (tytuł: **"Enhanced function of inhibitory presynaptic cannabinoid CB1 receptors on sympathetic nerves of DOCA-salt hypertensive rats"**) przeprowadzono w celu sprawdzenia, czy indukowane nadciśnienie ma wpływ na przekaznictwo współczulne w obrębie włókien unerwiających naczynia oporowe szczurów odrdzienionych i jednocześnie wagotomizowanych w drodze hamowania presynaptycznych receptorów

kannabinoidowych CB1 oraz znalezienia odpowiedzi czy endokannabinoidy są zaangażowane w ten mechanizm działania. W badaniach porównywano szczury poddane jednostronnej nefrektomii z nadciśnieniem indukowanym w modelu DOCA-salt ze zwierzętami z prawidłowym ciśnieniem tętniczym krwi (także poddanymi jednostronnej nefrektomii). Eksperymenty przeprowadzono na zwierzętach (obie grupy) dodatkowo odrdzienionych a jednocześnie mających przecięty nerw błędny (wagotomizacja). Podstawowym mierzonym parametrem było rozkurczowe ciśnienie krwi (DBP), ponieważ najlepiej koreluje ono z oporem naczyniowym. Zwiększenie rozkurczowego ciśnienia krwi indukowano przez stymulację elektryczną lub wstrzyknięcie fenylefryny.

Doktorant zademonstrował, że wpływ oddziaływania hamujących presynaptycznych receptorów CB1 na aktywność nerwów współczulnych jest bardziej nasilony u szczurów z nadciśnieniem indukowanym w modelu DOCA-salt. Wynika stąd, że hamowanie uwalniania noradrenaliny z nerwów współczulnych zaopatrujących naczynia oporowe, w którym pośredniczą presynaptyczne receptory CB1, może odgrywać rolę ochronną w przypadku nadciśnienia, szczególnie u zwierząt odpowiadających starszym wiekowo szczurom badanym w pracy nr 1. Jednakże nie udało się jednoznacznie wykazać, że FAAH oraz obwodowe receptory presynaptyczne CB1 zlokalizowane na zakończeniach włókien współczulnych mogą stanowić punkt uchwytu leków przeciwnadciśnieniowych. Ponieważ wiele efektów działania agonistów CB1 jak i związków hamujących FAAH jest zależnych np. od wieku czy przyjętego modelu doświadczalnego, Autor sugeruje przeprowadzenie dodatkowych badań w celu dokładniejszej charakterystyki zarówno samych tych związków, jak i możliwości ich stosowania w nadciśnieniu.

W związku z istotną obserwacją Doktoranta dotyczącą protekcyjnej roli układu endokannabinoidowego w nadciśnieniu, a co za tym idzie z potencjalną możliwością praktycznego wykorzystania tego układu jako celu terapeutycznego, nasuwa się pytanie jakie dalsze badania Doktorant zarekomendowałby wykonać?

W pracy tej na szczególną pochwałę zasługuje złożoność modeli badawczych (DOCA-salt, odrdzienienie, wagotomia, stymulacja elektryczna rdzenia) z przemyślanym wprowadzeniem związków oddziałujących zarówno na elementy układu endokannabinoidowego jak i na elementy współodpowiedzialnego za regulację ciśnienia układu współczulnego. Konstrukcja taka przez porównanie poszczególnych jednostkowych eksperymentów składających się na całość pracy zmierza do uzyskania ostatecznych wniosków w jak najmniejszym stopniu obciążonych wątpliwościami. Trudność i złożoność zarówno procedur medycznych jak i modeli doświadczalnych świadczy o bardzo dobrym przygotowaniu manualnym Doktoranta do pracy eksperymentalnej na zwierzętach.

Trzecia z kolei publikacja to bardzo rozległa pod względem zawartości merytorycznej praca przeglądowa pt. „**Enhanced endocannabinoid tone as a potential target of pharmacotherapy**”). Czynność ECS zostaje tu omówiona nie tylko w aspekcie układu krążenia i wpływu na nadciśnienie, ale prawdopodobnie wszystkich ważniejszych znanych zagadnień wiążących się z potencjalnymi medycznymi zastosowaniami, w których mogłoby być przydatne zwiększanie napięcia ECS. Autor wychodzi w omawianej pracy z twierdzenia, że aktywność układu endokannabinoidowego jest naturalnie stymulowana w licznych stanach patofizjologicznych, takich jak choroby o charakterze zapalnym, neurodegeneracyjnym, w niektórych chorobach przewodu pokarmowego, metabolicznych oraz układu sercowo-naczyniowego a także w bólu i nowotworach. Sugeruje się, że zjawisko to służy przede wszystkim jako naturalny mechanizm ochronny hamujący postęp i/lub zmniejszający objawy przedmiotowe i podmiotowe wybranych chorób. Co za tym idzie, także stymulowane z zewnątrz (lekami) dodatkowe wzmocnienie endogennego napięcia ECS przez hamowanie degradacji ustrojowych endokannabinoidów stanowi obiecujące terapeutyczne podejście w leczeniu wielu chorób. W sumie praca omawia dziesiątki związków (w większości jednak jeszcze nie przebadanych klinicznie) mogących stanowić potencjalne leki wzmagające napięcie ECS. Należy zaznaczyć, że poszczególne zagadnienia (tutaj zasygnalizowano jedynie część z nich) są omawiane w pracy bardzo szczegółowo.

Jaka jest opinia Doktoranta na temat wejścia w przyszłości do leczenia niektórych z omawianych związków?

Należy pamiętać, że efekty modulacji szlaków metabolicznych endokannabinoidów są złożone, ponieważ związki te mogą wywierać swoje działanie bezpośrednio lub poprzez liczne metabolity. Wiąże się to z ryzykiem potencjalnych działań niepożądanych (omawionych przez Doktoranta na stronach 29-33 w pracy poglądowej). Jaki sposób proponowałby Doktorant na zmniejszenie dawek, a co za tym idzie ograniczenie działań niepożądanych po podaniu potencjalnych leków zwiększających napięcie ECS ?

Na pochwałę zasługuje bogata grafika pracy nr 3 (pięć rycin, w tym cztery kolorowe) uprzystępniająca bardzo złożone powiązania, w których uczestniczy ECS. Ponadto w pracy zamieszczono pięć tabel systematyzujących wybrane aspekty omawiane w artykule oraz szereg wzorów strukturalnych omawianych związków. Bardzo bogate jest także piśmiennictwo pracy (308 pozycji), w dodatku dotyczy ono wielu lat (1997 – 2018), co obok samej treści artykułu świadczy o dokładności ujęcia tematu publikacji i rzetelnym podejściu Autora. Należy jedynie ubolewać, że niestety, poza faktem kilkukrotnego przywołania w charakterze źródła piśmiennictwa, praca nr 3 nie została nawet krótko streszczona w tekście maszynopisu.

Po trzech pracach stanowiących podstawę doktoratu w rozprawie zamieszczono rozdział „**Omówienie wyników i dyskusja**”. W dyskusji zwraca uwagę zdolność Doktoranta do wnikliwej krytycznej analizy wyników. Dyskusja została przeprowadzona poprawnie i uwzględniono w niej wszystkie ważniejsze wątki pracy.

Po zamknięciu dyskusji Doktorant sformułował cztery **wnioski** syntetycznie podsumowujące przeprowadzone badania. Wnioski te nie budzą zastrzeżeń.

Kolejny rozdział rozprawy stanowi **wykaz piśmiennictwa** (tu jako „Literatura”), liczący formalnie 33 pozycje (w istocie 32, gdyż omyłkowo niepotrzebnie zamieszczono tożsame pozycje 3 i 4 - Bátkai et al. 2004, str. 33). W odniesieniu do piśmiennictwa rozprawy ujmowanej jako całość (w tym piśmiennictwo zawarte w pracy nr 1, 2 i 3) należy dodać, że oparte jest ono na najnowszych publikacjach, lecz nie tylko na nich. Doktorant dokonał nie tylko dokładnego przeglądu prawdopodobnie całego dostępnego piśmiennictwa z zakresu stanowiącego treść rozprawy, ale wykazał się umiejętnością krytycznego korzystania z niego, zdolność selekcji i właściwej segregacji danych w odniesieniu do podjętego tematu, jak również zwięzłości opisu.

W pracy można znaleźć niewiele drobnych literówek i błędów interpunkcyjnych poczynając od zbędnej kropki po tytule rozprawy na stronie tytułowej; na str. 26 w opisie Ryc. 3 podano „T2-L5” zamiast „T2-L6” oraz „5-go kręgu” zamiast „szóstego kręgu”. To samo dotyczy wykazu skrótów na str. 6. Tymczasem w oryginale art. 2 (str. 79, sekcja 2.3 „Pithed rat”) podaje się wyrażenie „at vertebrae T2 –L6”; „presynaptyczne” zamiast poprawnie „presynaptyczne” – str. 8; „endokannabinoidowego” zamiast „endokannabinoidowego” oraz „monoacyloglicerololwa” zamiast „monoacyloglicerolowa” – w opisie ryc. 1 na s. 10; „hamowany” zamiast „hamowane” – str. 12; „ten same” zamiast „te same” – str. 14; „N,N-dimetyloforamid” zamiast „N,N-dimetyloformamid” – s. 21; „1 mg/kg AM3506 mg/kg” – s. 24; „presynapitc” zamiast „presynaptic”- s. 48 i inne. Te drobne błędy nie umniejszają wartości pracy.

Podsumowując, rozprawę doktorską Pana marka Toczka oceniam bardzo wysoko. Włączone do niej dwie prace doświadczalne zostały starannie zaprojektowane i przemyślane a ilość aspektów omówionych w pracy poglądowej nr 3 jest wręcz imponująca. Na uwagę zasługują prawidłowo zaplanowane i wykonane badania oraz wysoki stopień ich złożoności i trudności w wykonaniu (zwłaszcza połączenie w jednym modelu odrzucenia, stymulacji elektrycznej, wagotomizacji i

DOCA-salt). Część teoretyczna (zwłaszcza bardzo wnikliwie przeprowadzona dyskusja) jak i doświadczalna rozprawy świadczy o doskonałym przygotowaniu teoretycznym i manualnym Doktoranta, umiejętności organizowania pracy badawczej, a także planowania i rozwiązywania zagadnień naukowych. Wszystkie prace zawarte w rozprawie zostały opublikowane w renomowanych czasopismach o zasięgu międzynarodowym o wysokim współczynniku wpływu (łącznie IF 8,208). Udział Doktoranta (jako pierwszego Autora) w pracach oryginalnych wynosi ponad 50%, zaś w pracy przeglądowej ponad 80%. Całkowity IF dorobku naukowego Doktoranta wynosi 34,812.

Przedstawiając powyższą ocenę kieruję do Wysokiej Rady Naukowej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku wniosek o dopuszczenie Pana mgr Marka Toczka do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Wnioskuje także o wyróżnienie tej rozprawy.

KIEROWNIK
Zakładu Farmakodynamiki

Dr hab. n. farm. Magdalena Bujalska-Zadrożny