



Recenzja rozprawy doktorskiej

mgr. Marka Toczka

**pt. „Farmakologiczna ocena wybranych elementów układu endokannabinoidowego
jako potencjalnych punktów uchwytu terapii hipotensyjnej w doświadczalnym modelu
nadciśnienia DOCA-salt”.**

Nadciśnienie tętnicze zyskało nazwę choroby cywilizacyjnej i dotyczy około biliona ludzi na świecie. W Polsce co 4. osoba dorosła cierpi na tę dolegliwość. Nielezione nadciśnienie niszczy nerki i może być przyczyną zawału serca lub wylewu krwi do mózgu, a jego rozwojowi sprzyja także starzenie się organizmu. Ważnym czynnikiem, który znacząco podnosi ciśnienie krwi i obciąża nerki jest chlorek sodu (NaCl). Ten najważniejszy składnik soli kuchennej odgrywa kluczową rolę w wielu procesach fizjologicznych, a jego spożywanie jest niezbędne do życia. Tym niemniej, Światowa Organizacja Zdrowia i organizacje zdrowotne w różnych krajach zalecają ograniczenie takiego spożycia soli kuchennej (2-5 g dziennie), prognozując że takie ograniczenie spożycia zmniejszyłoby u pacjentów z nadciśnieniem ryzyko zgonów (na świecie odnotowuje się ich > 9 mln rocznie).

Nadciśnienie jest chorobą nieuleczalną i wymaga przyjmowania leków obniżających ciśnienie do końca życia. Pomimo stosowania takich leków, badania kliniczne wskazują że tylko u połowy wszystkich chorych ze zdiagnozowanym nadciśnieniem ciśnienie krwi jest pod kontrolą. Dlatego też badania prowadzone przez Doktoranta dotyczące poszukiwania nowych mechanizmów i farmakoterapii odpowiadających za regulację ciśnienia tętniczego, są ważne i jak najbardziej celowe.

Jednym z wielu układów uczestniczących w regulacji układu krążenia oraz potencjalny punkt uchwytu terapii hipotensyjnej jest układ endokannabinoidowy. Badania prowadzone przez wielu badawczy, w tym też – od wielu lat – przez zespół Prof. dr hab. Barbary Malinowskiej - wykazały, że ten układ neuroprzekaznikowy może odgrywać istotną rolę w patomechanizmie nadciśnienia, a jego ligandy mogą być potencjalnymi lekami przeciwnadciśnieniowymi. Pomysł włączenia do badań nad nadciśnieniem inhibitorów hydrolazy amidowej kwasów tłuszczowych, które zwiększają poziom m.in. anandamidu, jak też i bezpośrednich ligandów receptorów CB1 przyniósł istotne i pożądane wyniki. Przeprowadzone przez Doktoranta badania nad określeniem funkcji presynaptycznych receptorów kanabinoidowych CB1 występujących na włóknach współczulnych, jak też i ocena działania endokannabinoidów w zależności od wieku zwierząt poszerzają wiedzę na ten temat.

Doktorant swoją rozprawę doktorską przedstawił w formie cyklu opublikowanych prac, z dołączonym wprowadzeniem, omówieniem wyników i ich dyskusją, wnioskami, spisem literatury i streszczeniem w języku angielskim. Mgr Marek Toczka do cyklu prac wybrał trzy

w których jest jednym z autorów; dwie z tych prac są pracami oryginalnymi, a trzecia - pracą przeglądową. W pracach wchodzących w skład rozprawy, opublikowanych w czasopiśmie z listy filadelfijskiej, Doktorant jest pierwszym autorem, a oświadczenia pozostałych współautorów jednoznacznie wskazują na duży (50-80%) udział koncepcyjny oraz realizatorski mgr. Marka Toczka w ich powstanie.

W zwięzłym Wprowadzeniu Autor zaznajamia czytelnika z tematyką rozprawy, podając najnowsze informacje dotyczące obecnej wiedzy na temat nadciśnienia i przyczyn jego powstawania, opisuje regulację krążenia za pośrednictwem układu współczulnego. Kolejno Autor, na podstawie dostępnych danych klinicznych i badań przedklinicznych, przedstawia informacje dotyczące roli elementów układu endokannabinoidowego, ze szczególnym uwzględnieniem receptorów CB1, w regulacji układu krążenia. Ta część rozprawy została napisana przejrzysto, stąd z dużym uznaniem podkreślam umiejętność Doktoranta w wyborze istotnych informacji z rozległej literatury. Moja uwaga do tej części pracy dotyczy stosunkowo skromnego opisu regulacji ciśnienia tętniczego u tzw. osób „sodowrażliwych”.

Cel pracy został określony precyzyjnie, a dotyczył badań czy wielokrotne podania inhibitora hydrolazy amidów kwasów tłuszczowych oraz antagonisty i agonisty receptorów CB1 zmieniają wybrane parametry fizjologiczne w modelu nadciśnienia u szczurów. Autor w swoich badaniach farmakologicznych zastosował model nadciśnienia DOCA-salt, polegający na indukcji nadciśnienia poprzez podanie octanu deoksykortykosteronu oraz diety wysokosodowej (roztwór 1% NaCl) u zwierząt poddanych jednostronnej nefrektomii. W patogenezie tego nadciśnienia istotną rolę odgrywają pobudzenie układu współczulnego i szybki rozwój hipertrofii serca i nerek. Doktorant przeprowadził badania na młodszych (4. tygodniowe) i starszych (6-7. tygodniowe) osobnikach, uwzględniając wpływ wieku na wybrane parametry fizjologiczne. W innej serii eksperymentów Autor wykorzystał połączone modele DOCA-salt i szczura odrdzienionego. Ten ostatni model jest jedną z najlepszych procedur doświadczalnych *in vivo* służących do rejestracji zależnych od mechanizmów obwodowych zmian częstości akcji serca i ciśnienia krwi, a co więcej, umożliwia badanie funkcji presynaptycznych receptorów zlokalizowanych na włóknach współczulnych. Dla wyjaśnienia mechanizmu nadciśnienia DOCA-salt Doktorant zastosował dożylnie i dootrzewnowe oraz w różnych schematach dawkowania podania URB 597 (inhibitor hydrolazy amidów kwasów tłuszczowych), CP 55940 (agonista receptorów CB1) oraz AM 251 (antagonista/odwrotny agonista receptorów CB1).

Wyniki zawarte w 2 publikacjach oryginalnych przedstawionych w rozprawie doktorskiej mają duże znaczenie poznawcze w kontekście wyjaśniania znaczenia wybranych elementów układu endokannabinoidowego w nadciśnieniu wywołanym wysoką podażą sodu. Część doświadczalna rozprawy doktorskiej mgr. Marka Toczka zasługuje na wysoką ocenę. Autor bardzo dobrze opanował warsztat badawczy, realizując założone cele w oparciu o różne, bardzo skomplikowane technicznie procedury badawcze.

Uzyskane wyniki potwierdzają, że w wybranym modelu nadciśnienia dochodzi do podobnych i stabilnych zmian w ciśnieniu tętniczym krwi, przy braku zmian w częstości akcji serca, u szczurów młodszych i starszych. Niezależnie od wieku, zwierzęta z nadciśnieniem charakteryzowały się także niższą masą ciała i zwiększonym pobieraniem wody. Hipertrofia serca i nerek była większa u młodszych zwierząt, co wskazuje że wiek determinuje uszkodzenia narządowe w związku z nadciśnieniem wywoływanym dietą wysokosodową. W wybranym do badań modelu nadciśnienia, Doktorant wykazał także, że przewlekłe hamowanie hydrolazy amidów kwasów tłuszczowych powoduje obniżenie ciśnienia tętniczego u szczurów starszych, a zmniejszenie hipertrofii nerek i serca – u młodszych. Ciekawą obserwacją był brak wpływu wielokrotnych podań URB 597 na masę ciała zwierząt, pobieranie pokarmu, czy śmiertelność zwierząt, co wskazuje na bezpieczeństwo stosowania tego inhibitora hydrolazy amidów kwasów tłuszczowych u szczurów normotensyjnych i z nadciśnieniem.

W modelu szczura odrdzienionego dochodzi do wzrostu ciśnienia tętniczego i rozkurczowego, będących wynikiem zniesionej regulacji ośrodkowej i odruchowej. W tym modelu Autor analizował elementy presynaptyczne (mierzone osłabieniem stymulowanych elektrycznych wzrostów ciśnienia krwi) i postsynaptyczne (stymulowane za pomocą fenylefryny wzrosty ciśnienia rozkurczowego). Jak wykazał Doktorant, u zwierząt z nadciśnieniem indukowanym dietą wysokosodową szczury (badania przeprowadzono na starszych osobnikach) odrdzienione miały niższe wartości ciśnienia rozkurczowego i niższą częstość akcji serca niż ich normotensyjna kontrola. Pobudzenie presynaptycznych receptorów kannabinoidowych CB1 na włóknach współczulnych nasilało neurogeną odpowiedź presyjną, co można interpretować jako zjawisko protekcyjne. Z drugiej strony, ani inhibitor FAAH ani antagonist/odwrotny agonista receptorów kannabinoidowych CB1 (podania jednorazowe) nie zmieniały wartości ciśnienia rozkurczowego w grupie zwierząt z nadciśnieniem i kontrolnych.

Do części doświadczalnej pracy doktorskiej mam kilka uwag:

- brak informacji o cyklu dobowym w jakim przebywały zwierzęta (naturalny czy odwrócony);
- brakuje informacji o efekcie jednorazowego podania URB 597 (1 mg/kg, ip) w modelu DOCA-salt;
- brakuje wyników testów F i Studenta w analizach statystycznych;
- Doktorant swoje wnioskowanie oparł na podstawie doświadczeń wykonanego z 1 wybraną dawką związków;
- występowanie zbyt dużej różnicy w liczebności zwierząt w grupie (n=4-16). Liczba zwierząt w niektórych eksperymentach w grupie (4-5) była zbyt mała, aby wyciągane przez Autora wnioski mogły być daleko idące.

Dyskusja wskazuje kolejny raz na dobrą znajomość tematu oraz doskonale opanowanie z dokonaniach innych badaczy w tym obszarze badań. Doktorant podkreśla nowe elementy, jakie Jego badania wniosły do ogólnej wiedzy. Badania te po raz pierwszy wykazały że przewlekłe hamowanie hydrolazy amidów kwasów tłuszczowych w doświadczalnym modelu nadciśnienia tętniczego DOCA-salt powoduje obniżenie ciśnienia tętniczego u szczurów starszych i zmniejszenia hipertrofii nerek i serca u zwierząt młodszych. Dodatkowo u szczurów starszych w tym modelu nadciśnienia dochodzi do nasilenia odpowiedzi ze strony presynaptycznych receptorów kannabinoidowych CB1. Pracę i wnioskowanie na pewno poszerzyłyby dodatkowe analizy farmakologiczne (wyjaśnienie mechanizmu działania URB 597, z uwagi na brak jego selektywności wobec hydrolazy amidów kwasów tłuszczowych) i neurochemiczne (oznaczenia poziomu endokannabinoidów w tkance).

Praca doktorska zakończona jest 4 wnioskami oraz streszczeniem pracy w języku angielskim.

Rozprawa została bardzo starannie przygotowana, choć Autor popełnił kilka (drobnych) błędów o których wspomnę z obowiązku recenzenta. Należą do nich:

- niekonsekwentne stosowanie skrótów (np. NA);
- błędy edytorskie (str. 5,9,10,13,21).

Błędy te jednakże nie obniżają wartości ocenianej rozprawy.

PODSUMOWANIE

W podsumowaniu stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr. Marka Toczka zawiera wartościowe wyniki badań oraz ma dużą wartość poznawczą. Badania przeprowadzone z wykorzystaniem różnorodnych procedur i zawansowanych metod badawczych pozwoliły określić stopień zaangażowania wybranych elementów układu endokannabinoidowego w mechanizmach związanych z nadciśnieniem w modelu DOCA-salt u szczurów. Z pełnym

przekonaniem mogę stwierdzić, że w przedstawionej do oceny pracy doktorskiej w pełni został osiągnięty zamierzony cel naukowy, a Doktorant wykazał się w niej doskonałym opanowaniem warsztatu badawczego i dobrą znajomością piśmiennictwa z zakresu tematyki prowadzonych badań. Należy dodać, że mgr Marek Toczek – poza trzema publikacjami stanowiącymi rozprawę doktorską z których dwie oryginalne są cytowane 6-10 razy (10.08.2018 r.) – ma w dorobku publikacyjnym 5 prac oryginalnych i jedną pracę przeglądową, które zostały również opublikowane w czasopismach z listy JCR.

Stwierdzam, że przedstawiona do oceny praca doktorska spełnia wszystkie wymagania – określone w Ustawie nr 595 o Stopniach Naukowych i Tytule Naukowym oraz Stopniach i Tytule w Zakresie Sztuki z dnia 14.03.2003 r. (wraz z późniejszymi zmianami) – stawiane takim dysertacjom. W związku z powyższym mam zaszczyt przedstawić Wysokiej Radzie Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku wniosek o dopuszczenie pana mgr. farm. Marka Toczka do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Równocześnie, ze względu na szeroki zakres przeprowadzonych badań i wysoki poziom naukowy ocenianej rozprawy oraz opublikowanie wyników badań w formie trzech prac w czasopismach posiadających współczynnik wpływu przedkładał Wysokiej Radzie **wniosek dotyczący wyróżnienia rozprawy doktorskiej mgr. Marka Toczka.**

Kraków, 10. 08. 2018 r.

Z-ca Dyrektora ds. Naukowych
Instytutu Farmakologii
Polskiej Akademii Nauk


Prof. dr hab. Małgorzata Filip