

Białystok, 2023-09-05

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

mgr farmacji Anety Marty Sawickiej

pt. „Udział zmian naczyniowych w rozwoju sodo-zależnego nadciśnienia tętniczego. Porównanie skuteczności inhibitorów lokalnego i osoczowego układu renina-angiotensyna w leczeniu tego typu nadciśnienia”

wykonanej w Instytucie Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. Mirosława Mossakowskiego PAN pod opieką promotorską **prof. dr hab. Ewy Koźniewskiej-Kołodziejskiej** i promotora pomocniczego **dr n. med. Krzysztofa Olszyńskiego**.

Nadciśnienie tętnicze (NT) pomimo dostępu do coraz lepszych narzędzi diagnostycznych i coraz nowocześniejszych metod leczenia pozostaje najważniejszym modyfikowalnym czynnikiem ryzyka chorób układu krążenia, a według Światowej Organizacji Zdrowia (WHO, World Health Organization) jest wciąż pierwszą przyczyną przedwczesnych zgonów na świecie. Wysokość ciśnienia tętniczego wykazuje liniowy związek ze śmiertelnością i zapadalnością na choroby układu krążenia (zawał serca, udar, choroba tętnic obwodowych), niewydolność nerek, we wszystkich grupach wiekowych, etnicznych, zarówno u kobiet, jak i mężczyzn. Jednym z czynników ryzyka rozwoju NT jest nadmierne spożycie soli. Udowodniono związek przyczynowo-skutkowy pomiędzy spożyciem soli a wartościami ciśnienia tętniczego i sztywnością naczyń. Nadmierne spożycie soli może przyczynić się do oporności w leczeniu NT (Tykarski i wsp., 2019, Wytyczne Polskiego Towarzystwa Nadciśnienia Tętniczego, Nadciśnienie Tętnicze w Praktyce, 5, 1, 1–86).

Od wielu lat uwaga badaczy - w tym i naukowców z Pracowni Neurochirurgii Doświadczalnej i Klinicznej Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. Mirosława Mossakowskiego PAN w Warszawie skupiona jest na ocenie regulacji napięcia ściany naczyń krwionośnych, w tym podczas zaburzonej gospodarki sodowej, tj. diety bogato-sodowej i sodo-zależnego NT. Dieta bogata w chlorek sodu jest obecnie uznawana za jeden z głównych czynników rozwoju i postępu NT, szczególnie w przypadku dysfunkcji nerek czy zjawiska sodowrażliwości występującego u około 30% populacji, w konsekwencji zwiększa ryzyko zawału serca czy udaru mózgu. Na przestrzeni ostatnich dekad wyniki badań eksperymentalnych, obserwacyjnych i klinicznych wykazały, że ciśnienie krwi może zostać obniżone wraz z ograniczeniem spożycia soli, a ograniczenie spożycia chlorku sodu jest głównym postulatem zarówno prewencji, jak i niefarmakologicznego leczenia NT zgodnym z wcześniej cytowanymi wytycznymi Polskiego Towarzystwa Nadciśnienia Tętniczego. Dodatkowo dysfunkcja naczyń krwionośnych stanowić może zarówno przyczynę, jak i konsekwencję wzrostu ciśnienia krwi zarówno w krążeniu systemowym, jak i mózgowym. Zmiany strukturalne i dysfunkcja skurczowo-rozkurczowa

naczyń krwionośnych może wystąpić już we wczesnym etapie, a także jest jednym z podstawowych czynników prowadzących do upośledzonej wazorelaksacji, nadmiernej wazokonstrykcji, przebudowy naczyń krwionośnych i w konsekwencji wzrostu ciśnienia krwi. Z drugiej strony osłabienie funkcji rozkurczowej odpowiada za wzrost oporu obwodowego i powikłań sercowo-naczyniowych. Obecnie główne strategie terapeutyczne mają na celu nie tylko obniżenie ciśnienia krwi, ale również skorygowanie dysfunkcji śródbłonna naczyń systemowych i/lub mózgowych, zmian hipertroficzyń i przywrócenie równowagi pomiędzy brakującymi czynnikami wazodylatacyjnymi o aktywności przeciwproliferacyjnej oraz nadmiernie produkowanymi naczyniokurczącymi i aktywującymi komórki śródbłonna naczyniowego. Pomimo wielu leków o potencjale hipotensyjnym i wprowadzeniu do standardów leczenia NT terapii skojarzonych ponad 70% pacjentów wciąż posiada podwyższone lub suboptymalne wartości ciśnienia krwi.

W świetle powyższych danych, tematyka przedstawionej mi do oceny pracy doktorskiej mgr farm. Anety Marty Sawickiej jest aktualna i naukowo uzasadniona o ważnym znaczeniu poznawczym, a także potencjalnym znaczeniu klinicznym. Doktorantka podjęła interesujące i nowatorskie badania w warunkach *in vivo* (szczury z pozorowaną nefrektomią na diecie normo- i bogatosodowej, szczury poddane nefrektomii i diecie normo- i bogatosodowej tj. model sodo-zależnego NT, w tym poddane leczeniu enalaprilem i chymostatyną), *ex vivo* (izolowane tętnice środkowe mózgu, MCA, i tętnice zaopatrujące mięsień smukły, GMA) oraz szereg analiz biochemicznych.

Celem tych przedklinicznych doświadczeń była ocena następujących hipotez: 1/ Długotrwałe stosowana dieta wysokosodowa wywołuje zmiany czynnościowe w obwodowych naczyniach krwionośnych typu oporowego, które mają istotny wpływ na rozwój sodo-zależnego NT, i w tętnicy środkowej mózgu, prowadząc do zaburzenia śródbłonkozależnej regulacji krążenia mózgowego; 2/Długotrwała dieta wysokosodowa wpływa niekorzystnie na mikrobiotę jelitową, prowadząc do nadmiernej produkcji trimetyloaminy TMA i jej utlenowanej pochodnej TMAO; 3/ Rozwój sodo-zależnego NT jest związany zarówno z pobudzeniem osoczkowego, jak i lokalnego układu renina-angiotensyna; 4/ inhibitory chymazy są skuteczniejsze w leczeniu sodo-zależnego NT niż inhibitory osoczkowego enzymu konwertującego angiotensynę (ACE-I). Hipotezy weryfikowano realizując szczegółowe cele, tj. a/ określenie wpływu wysokiej podaży sodu i sodo-zależnego NT na odpowiedź tętnicy zaopatrującej mięsień smukły oraz tętnicy środkowej mózgu na substancje naczyniokurczące (agonistę receptora AT1 i endotelinę ET-1) oraz substancje naczyniorozszerzające zależne od tlenu azotu acetylocholinę i ATP; b/ określenie udziału tlenu azotu w kształtowaniu podstawowego napięcia ściany obu badanych tętnic przy użyciu inhibitora syntazy tlenu azotu (estru metylowego nitro-L-argininy, L-NAME); c/ określenie wpływu wysokiej podaży sodu i sodo-zależnego NT na stan glikokaliksu śródbłonna naczyniowego (oznaczenie syndekanu-1, wskaźnika uszkodzenia glikokaliksu), stężenia azotynów i ADMA, endogennego inhibitora syntazy NO; d/ porównanie efektywności hipotensyjnego i naczyniowego wpływu inhibitora osoczkowego ACE, enalaprilu, i tkankowego, chymostatyny. Praca ta została wykonana pod kierownictwem naukowym prof. dr hab. Ewy Koźniewskiej-Kołodziejskiej i dr n. med. Krzysztofa Olszańskiego. Przedstawione w pracy badania były finansowane z programu KNOW-MMRCC/KNOW05 pt. „Udział zmian naczyniowych w rozwoju sodo-zależnego nadciśnienia tętniczego”.

Charakterystyka rozprawy doktorskiej

Rozprawa napisana została w języku polskim i składa się z 8 rozdziałów, które przedstawiono na 122 stronach (numeracja wprowadzona została od strony tytułowej). Rozprawa ma typowy dla prac doktorskich układ i zawiera Streszczenie w języku polskim i angielskim, Wykaz skrótów, Innowacyjność rozprawy, Wstęp, Hipotezy badawcze, Materiał i Metody, Wyniki i Podsumowanie wyników, Dyskusję, Wnioski, Piśmiennictwo. Rozprawa zawiera 19 rycin i 6 tabel plus 3 dodatkowe tabele w Suplemencie

wyników, na których zaprezentowano założenia pracy (Wstęp), schematy doświadczalne (Materiał i Metody) oraz wszystkie uzyskane rezultaty badań (Wyniki, w tym Suplement). Rozprawa doktorska rozpoczyna się streszczeniem w języku polskim i angielskim oraz wykazem skrótów i co bardzo ciekawe, wypunktowaniem innowacyjności rozprawy. Wstęp liczy 23 strony, w którym Doktorantka wprowadza w tematykę budowy i udziału naczyń tętnicznych w regulacji ciśnienia tętniczego krwi, nerki jako narządu utrzymującego homeostazę sodową czy układ renina – angiotensyna. We wstępie przedstawione zostały też aktualne informacje dotyczące wpływu diety wysokosodowej na układy zaangażowane w regulację ciśnienia krwi. Należy zaznaczyć, że informacje zawarte we wstępie uzasadniają w pełni zakres badań podjętych przez Doktorantkę, a poszczególne części Wstępu zostały napisane zgodnie z obecnym stanem wiedzy, syntetycznie i przejrzysto w oparciu o liczne pozycje literatury. Moje drobne sugestie dotyczące tej części Rozprawy to cytowanie nieaktualnych wytycznych PTNT z roku 2013 (nie z 2019), naprzemienne używanie skrótu EDHF i EDH, podczas gdy od roku 2013 ze względu na mnogość czynników zaangażowanych w ten proces, używanie określenia EDHF okazało się kłopotliwe i stało się nieaktualne, gdyż nazwa mylnie sugeruje istnienie tylko jednego czynnika, zaleca się, stosowanie terminu: „hiperpolaryzacja zależna od śródbłonka” do opisu całego procesu zachodzącego w naczyniach krwionośnych o małej średnicy [Feletou i Vanhoutte, 2013 DOI: 10.1097/FJC.0b013e31828197bc]. Wymieniając substancje naczyniokurczące i -rozkurczające Doktorantka powinna zachować ostrożność, gdyż np. PGE2 może prowadzić zarówno do skurczu jak i rozkurczu, w zależności od rodzaju receptorów, które pobudza, podobnie inne związki wymienione na str. 26.

W rozdziale zatytułowanym Hipotezy badawcze Doktorantka przedstawiła 4 hipotezy, a następnie cele szczegółowe. Hipoteza/ Cel pracy zostały sformułowane w sposób przejrzysty, a planowane doświadczenia służące jego realizacji zostały logicznie skonstruowane. Warto podkreślić, że Autorka w swoich badaniach po raz pierwszy porównała efektywność hipotensyjnego działania inhibitorów osocznego (enalapirilu) i lokalnego (chymostatyny) układu RAA w sodo-zależnym NT czy porównała i wykazała różnice we wpływie diety wysokosodowej i sodo-zależnego NT na funkcję właściwych naczyń oporowych biorących udział w regulacji całkowitego oporu naczyniowego i mózgowego, co zostało wyszczególnione w rozdziale Innowacyjność pracy.

W swoich badaniach Doktorantka wykorzystwała zwierzęta Sprague – Dawley (stado bez genetycznych predyspozycji do rozwoju NT), które utrzymywane było na diecie normo- lub bogatosodowej. Dodatkowo, Doktorantka oceniała reaktywność obwodowych i mózgowych izolowanych naczyń krwionośnych w modelu *ex vivo*. Uzupełnieniem badań *in vivo* i *ex vivo* była analiza moczu i osocza, w tym określenie stężenia angiotensyny II, metabolitów NO, TMA, TMAO, ADMA i syndekanu-1 w osoczu.

Rozdział trzeci (Materiał i Metody) zawiera informacje dotyczące finansowania badań oraz stosownych pozwoleń na doświadczenia na zwierzętach. Autorka dokładnie opisuje zwierzęta, podział na grupy badawcze oraz przebieg doświadczeń *in vivo* i *ex vivo*, w tym szczegółowo opisuje procedury indukcji nadciśnienia sodo-zależnego, pomiaru parametrów w klatkach metabolicznych, ciśnienia krwi metodą mankiętową oraz podawania chronicznego związków, dokładną procedurę badania reaktywności izolowanych naczyń krwionośnych w arteriografii, analizy chemiczne i biochemiczne próbek osocza i moczu. Rozdział zakończony jest opisem procedur statystycznych wykorzystanych do analizy wyników. Moje drobne uwagi dotyczące tej części rozprawy, na które z obowiązku recenzenta zwracam uwagę, nie umniejszają jej wartości i dotyczą doprecyzowania pewnych kwestii metodycznych:

- czy zwierzęta przebywały w cyklu dobowym naturalnym czy odwróconym?
- z czego wynika różna liczba zwierząt w grupach?
- jakie wartości ciśnienia krwi determinowały kryterium rozwoju NT u badanych zwierząt?
- czy te same kryteria żywotności obowiązywały oporowe naczynia mózgowie i obwodowe?

- czy Doktorantka przeprowadzała również test na obecność śródbłonka?
 - czy Doktorantka stosowała kumulacyjną metodę podawania stężeń?
 - uzupełnienie nazwy międzynarodowej Metacanu stosowanego jako pooperacyjny środek przeciwbólowy (streszczenie w języku polskim i angielskim, materiał i metody), czy nazwy chemicznej agonisty receptorów AT1;
 - przy acetylocholinie dodanie stężenia 5×10^{-9} ;
 - podanie informacji na podstawie jakich danych czy jakiej literatury zostały dobrane stężenia/dawki zastosowanych substancji.
- Dodatkowo interesującym byłoby przedstawienie wyników jako % odpowiedzi w odniesieniu do odpowiedzi substancji referencyjnej, a nie przedstawienie wartości bezwzględnych.

W rozdziale czwartym (Wyniki) Autorka przedstawiła wpływ 1/ 28-dniowej diety wysokosodowej na wybrane parametry fizjologiczne (masę ciała, zmiany ciśnienia tętniczego i stężenia sodu w osoczu czy wyniki pomiarów dobowych w kłatkach metabolicznych, w tym spożycie wody, diurezę i natriurezę); wysokiej podaży sodu i sodo-zależnego NT 2/na reaktywność izolowanych naczyń krwionośnych (odpowiedź na substancje naczyniokurczące i śródbłonkozależne naczyniorozszerzające oraz syntazy tlenu azotu) i 3/ osoczowe stężenia angiotensyny II, azotynów, ADMA, syndekanu-1, TMA, TMAO, a następnie 4/ efektywność leczenia enalapilem (5 mg/kg, 10 mg/kg, 20 mg/kg, 40 mg/kg) i chymostatyną (1 mg/kg, 2 mg/kg, 4 mg/kg, 6 mg/kg), w tym na ciśnienie krwi (SBP, DBP, MBP), stężenie sodu w osoczu i reaktywność naczyń (GMA na agonistę receptora AT1, MCA na ATP, GMA i MCA na zablokowanie syntazy tlenu azotu) i osoczowy pomiar stężenia metabolitów NO. Doktorantka uzyskała ciekawe wyniki, które przedstawiła na 16 rycinach i w 8 tabelach. Ryciny są bardzo czytelne, dzięki przejrzystej i konsekwentnej przypisanym poszczególnym grupom kolorystyce, a opis wyników jest jasny i przejrzysty. Część doświadczalna rozprawy doktorskiej mgr farm. Anety Marty Sawickiej zasługuje na wysoką ocenę, a uzyskane wyniki mają znaczenie poznawcze. Doktorantka znakomicie opanowała warsztat badawczy, realizując założone cele badawcze w oparciu o bardzo precyzyjne i wymagające doskonałego manualnego przygotowania procedury. Na uwagę zasługuje rozdział 5, w którym Doktorantka w 11 punktach podsumowuje uzyskane wyniki. Jedyna drobna sugestia dotycząca tej części pracy - w tabelach i na rycinach brak informacji o zastosowanym teście statystycznym.

W 19-stronnicowym rozdziale szóstym (Dyskusja) Autorka wnikliwie omawia i dyskutuje uzyskane wyniki badań. Dyskusja została podzielona na 5 podrozdziałów, w których opisała m.in. model badawczy, udział jonów sodu i nadciśnienia sodo-zależnego jako czynników uszkadzających naczynia krwionośne oraz śródbłonek naczyniowy, a w ostatnim podrozdziale porównała skuteczność zastosowanych terapii hipotensyjnych. Dyskusja została poprowadzona logicznie i w oparciu o dane literaturowe. Niewątpliwie bardzo pomocne w interpretacji wyników byłoby zbadanie ekspresji poszczególnych komponent układu RAA, w tym ACE czy ACE-2, receptorów AT1 i AT2. Dodatkowo interesującym i w kontekście rozwoju zmian naczyniowych, jak i skuteczności zastosowanego leczenia byłaby ocena hipertrofii badanych naczyń.

W rozdziale siódmym (Wnioski), Doktorantka formułuje 6 końcowych wniosków. Praca doktorska zakończona jest wykazem piśmiennictwa (rozdział 8). Piśmiennictwo w liczbie 277 publikacji, w tym 145 zostało opublikowane w ciągu ostatnich 15 lat, zostało odpowiednio dobrane i zacytowane. Autorka cytowała zarówno starsze prace źródłowe, co jest pozytywne, natomiast pewnym mankamentem jest mała liczba prac z lat 2019-2023.

Najważniejsze osiągnięcia rozprawy doktorskiej:

Uzyskane przez mgr farm. Anetę Martę Sawicką wyniki badań wskazują, że wysoka podaż sodu w diecie wywołuje zmianę fenotypu obwodowych naczyń oporowych na fenotyp pro-nadciśnieniowy i prowadzi

do dysfunkcji śródbłonka, w tym upośledza podstawowe śródbłonkowe wydzielanie tlenu azotu na skutek uszkodzenia glikokaliksu oraz uruchamia alternatywne dodatkowe ścieżki odpowiedzi na substancje naczyniorozszerzające. Dodatkowo w sodo-wrażliwym NT tętnica środkowa mózgu jest bardziej wrażliwa na uszkodzenie niż obwodowe tętnice oporowe, osoczowy i tkankowy układ renina-angiotensyna zaangażowane są w patomechanizm tego typu NT, inhibitor tkankowego układu renina - angiotensyna chymostatyna wykazuje silniejszy potencjał hipotensyjny i wazoprotekcyjny niż osoczowy inhibitor tego układu, enalapril. Podsumowując, postawione przez Doktorantkę cele zostały zrealizowane, a zaprezentowane w rozprawie osiągnięcia świadczą o dużej wiedzy teoretycznej oraz solidnym warsztacie metodologicznym Doktorantki. Sformułowanie wniosków na podstawie tak obszernej liczby wyników nie jest łatwym zadaniem, tym bardziej należy podkreślić dojrzałość naukową Doktorantki.

Drobne uwagi redakcyjne: niezręczne sformułowania: „...sód kumuluje się gdzieś w ustroju”, „...dysfunkcja śródbłonka może być sama w sobie”, niekonsekwentne stosowanie skrótów (np. RAS/RAAS, TXA2/TxA2) czy brak wyjaśnienia niektórych skrótów w liście skrótów (np. SDC-1), w tekście, przy pierwszym pojawieniu się np. COX-1 czy na rycinach (np. Ryc. 1, 2, rycinach przedstawiających wyniki) lub kilkakrotne wyjaśnienie tego samego skrótu (np. RVLM).

Należy podkreślić, że uwagi te jednakże nie obniżają wartości ocenianej rozprawy, a będą przydatne podczas przygotowywania - na bazie otrzymanych wyników – publikacji do druku.

Ogólna ocena rozprawy doktorskiej

Walory poznawcze, zakres badań, poprawna metodologia, a także ambitnie zrealizowany cel pozwalają stwierdzić, że rozprawa doktorska mgr farm. Marty Anety Sawickiej zasługuje na bardzo wysoką ocenę, a drobne uwagi nie umniejszają jej wartości merytorycznej. Dysertacja zawiera oryginalne osiągnięcia naukowe i spełnia wszystkie kryteria i wymogi ustawowe stawiane rozprawom na stopień doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne (określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki Dz.U. z 2003 r., nr 65 poz. 595 z późniejszymi zmianami). Uzyskane dane są ważne nie tylko z naukowego punktu widzenia, ale i mogą przyczynić się do wytyczenia kierunków poszukiwań nowych terapii poprawiających funkcje śródbłonka i działających przeciwnadciśnieniowo.

W związku z tym mam zaszczyt przedstawić wniosek do Wysokiej Rady Naukowej Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. Mirosława Mossakowskiego PAN w Warszawie o dopuszczenie Pani mgr farm. Anety Marty Sawickiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.