



WARSZAWSKI  
UNIwersytet  
MEDYCZNY

KATEDRA I ZAKŁAD FIZJOLOGII DOŚWIADCZALNEJ I KLINICZNEJ

Warszawa, 6 września 2023 r.

### RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu, w dyscyplinie nauki medyczne,

**mgr farm. Anety Marty Sawickie, pt.: „Udział zmian naczyniowych w rozwoju sodoozależnego nadciśnienia tętniczego. Porównanie skuteczności inhibitorów lokalnego i osocznego układu renina-angiotensyna w leczeniu tego typu nadciśnienia”**

uszykowanej pod opieką promotorską Pani **prof. dr hab. Ewy Koźniewskiej-Kołodziejkiej** oraz opieką promotora pomocniczego Pana **dr n. med. Krzysztofa H. Olszyńskiego** w Instytucie Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. Mirosława Mossakowskiego Polskiej Akademii Nauk w Warszawie.

Nadciśnienie tętnicze jest głównym modyfikowalnym czynnikiem chorobowości i ryzyka zgonu z przyczyn sercowo-naczyniowych i ma najczęściej charakter pierwotny. Wraz ze wzrostem ciśnienia rośnie ryzyko wystąpienia udaru mózgu, zawału i niewydolności serca, niewydolności nerek, a także pogorszenia funkcji poznawczych i rozwoju otępienia. Patogeneza nadciśnienia tętniczego pierwotnego jest złożona i nie w pełni poznana. Istotną rolę w jego rozwoju odgrywa zwiększona aktywność układu renina-angiotensyna-aldosteron. Wiadomo też, że nadmierne spożycie soli kuchennej, które dotyczy większości osób z krajów rozwiniętych, istotnie przyczynia się do występowania nadciśnienia tętniczego. Jednocześnie zmniejszenie spożycia chlorku sodu wiąże się z obniżeniem ciśnienia tętniczego zarówno u osób z normo- jak i hipertensją. Obserwacje te znajdują swoje odzwierciedlenie w wysokiej skuteczności farmakoterapii nadciśnienia nacelowanej na hamowanie konwertazy angiotensyny oraz blokowanie receptorów AT1 dla angiotensyny, a także w zaleceniach

redukcji spożycia soli kuchennej. Chociaż zwiększone spożycie sodu wiąże się z zahamowaniem aktywności osoczowego układu renina-angiotensyna, szereg badań wskazuje, że ekspresja składowych układu renina-angiotensyna w tkankach ulega zwiększeniu, między innymi w obrębie naczyń krwionośnych.

Jednym z kluczowych parametrów wpływających na wartości ciśnienia tętniczego jest opór naczyniowy, który wykładniczo zmienia się wraz ze zmianami średnicy naczyń, w szczególności oporowych naczyń tętniczych. Światło naczyń tętniczych jest wypadkową działania czynników je zwężających, w tym angiotensyny II, czynników śródbłonkowych (endotelina 1, tromboksan), noradrenaliny uwalnianej z zakończeń współczulnych i jej kotransmiterów (ATP, NPY) oraz czynników rozszerzających naczynia, szczególnie tlenu azotu i prostacykliny.

Mimo wieloletnich badań, mechanizmy związane z niekorzystnym wpływem nadmiernego spożycia soli na rozwój i przebieg nadciśnienia tętniczego pozostają istotnym zagadnieniem badawczym i klinicznym. Szczególnie wpływ diety wysokosodowej na naczynia krwionośne nie jest w pełni poznany. W tym kontekście wybór objętego przez Doktorantkę tematu badań wydaje się szczególnie istotny.

W badaniach będących podstawą recenzowanej pracy Doktorantka podjęła się zbadania wpływu diety wysokosodowej i nadciśnienia tętniczego na zmiany reaktywności naczyń tętniczych oraz udziału osoczowego i tkankowego układu renina-angiotensyna w rozwoju nadciśnienia sodo-zależnego i zmian reaktywności tętnicy środkowej mózgu oraz obwodowej tętnicy zaopatrującej mięsień smukły w sznurzym modelu doświadczalnym nadciśnienia tętniczego indukowanego dietą wysokosodową i jednostronną nefrektomią.

Cel rozprawy ma nie tylko ważne znaczenie dla lepszego poznania patomechanizmów nadciśnienia tętniczego, ale również może mieć potencjalne znaczenie kliniczne i przełożyć się na projektowanie badań u ludzi.

Przedstawiona do oceny dysertacja Pani mgr farm. Anety M. Sawickiej ma typowy układ prac doktorskich w formie monografii. Zawiera osiem rozdziałów, na które składają się: Wstęp, Hipotezy badawcze, Materiały i metody, Wyniki, Podsumowanie wyników, Dyskusja, Wnioski i Piśmiennictwo. Całość poprzedzona jest streszczeniem w języku polskim i angielskim, które precyzyjnie oddaje zawartość pracy. Poszczególne rozdziały są w logiczny sposób



podzielone na odrębne sekcje, co ułatwia zapoznanie się z ich zawartością. Praca zawiera 122 strony maszynopisu, 19 rycin, 9 tabel, w tym 3 w ramach suplementu, 277 pozycji piśmiennictwa oraz wykaz skrótów. Zwraca uwagę staranna redakcja pracy oraz dbałość o czytelne ryciny. Nieliczne błędy interpunkcyjne oraz czasami niepotrzebnie używane anglicyzmy nie mają istotnego wpływu na bardzo wysoki poziom językowy i edytorski dysertacji.

Wstęp jest spójny i wprowadza w tematykę badawczą pracy. Doktorantka przedstawiła w nim kluczowe mechanizmy regulujące ciśnienie tętnicze, w tym rolę naczyń oporowych i ich regulacji przez czynniki nerwowe, humoralne i śródłonkowe, funkcję nerki w utrzymywaniu stałego ciśnienia poprzez diurezę/natriurezę presyjną, a także szeroko przedstawia układ renina-angiotensyna. Ostatni podrozdział omawia wpływ zwiększonego przyjmowania sodu na powyższe mechanizmy. Doktorantka odwołuje się w nim m.in. do klasycznych modeli regulacji ciśnienia – naczyniowego i nerkowego – zaproponowanych odpowiednio przez Folkowa i Guytona, co należy uznać za szczególnie słuszne w kontekście badania reaktywności naczyń tętniczych w warunkach zwiększonej podaży soli i redukcji miększu nerki. Cieszy również odwołanie się przez Doktorantkę do klasycznych artykułów twórców ścierających się do dzisiaj koncepcji patogenezy nadciśnienia tętniczego. Pewien niedosyt zostawia ubogie udokumentowanie pozycjami bibliograficznymi podrozdziału 1.2.3 *Aparat przykłębuszkowy i jego znaczenie dla homeostazy sodowej* oraz wstępu do podrozdziału 1.3 *Układ renina-angiotensyna*. W moim odczuciu zbyt krótko omówiony został wpływ diety wysokosodowej na mikrobiotę jelitową i potencjalny udział jej metabolitów, w tym trimetyloaminy (TMA) i jej utlenowanej pochodnej TMAO, na regulację ciśnienia, które były badane w pracy. Z obowiązku recenzenta muszę wskazać też, że rozrost to inaczej hiperplazja, natomiast hipertrofia oznacza przerost i ten termin powinien być użyty w pracy. Ponadto angiotensynogen jest dużym białkiem, alfa2-makroglobuliną, a nie peptydem.

Obszerna lista piśmiennictwa została dobrana i zastosowana poprawnie i odpowiednio do tematyki pracy badawczej. Niemniej część starszych pozycji piśmiennictwa, szczególnie prac o charakterze pogładowym, mogłaby być uzupełniona lub zastąpiona bardziej aktualnymi publikacjami. Zwróciłbym tutaj szczególną uwagę na powoływanie się na europejskie wytyczne rozpoznawania i leczenia nadciśnienia tętniczego z 2007 oraz 2013 roku, które były aktualizowane w 2018 roku i obecnie obowiązują. Również w przypadku powoływania się na

monografie naukowe lub podręczniki akademickie, tak jak w przypadku przytaczanego podręcznika lekarskiego do histologii (Sawicki, 1993), warto również wskazać odpowiedni rozdział, w których zawarta jest wykorzystana informacja

Pomimo powyższych uwag, wstęp stanowi dobre wprowadzenie do dalszych części pracy doktorskiej i przygotowuje koncepcyjne fundamenty pod hipotezy badawcze i cele szczegółowe projektu postawione przez Doktorantkę kolejnym rozdziale. Założenia i cele pracy zostały sformułowane prawidłowo i wskazują na dobrze przemyślany i przygotowany plan badawczy.

Przeprowadzone przez Doktorantkę badania były finansowane z programu KNOW-MMRC/Know05 „Udział zmian naczyniowych w rozwoju sodo-zależnego nadciśnienia tętniczego (2013-2017)”, a uzyskane wyniki były przedstawiana w postaci pięciu doniesień na konferencyjach naukowych polskich i zagranicznych; we wszystkich tych doniesieniach Doktorantka była pierwszym autorem. Doświadczenia opisane w dysertacji zostały przeprowadzone na 140 samcach szczurów Sprague-Dawley po uzyskaniu odpowiednich zgód Lokalnej Komisji Etycznej ds. Badań na Zwierzętach Doświadczalnych w Warszawie, co udokumentowane jest w pracy doktorskiej poprzez podane odpowiednich numery uchwał.

Doktorantka wybrała żmudny i długotrwały model doświadczalny wymagający przewlekłej opieki nad zwierzętami podczas stosowania diety wysokosodowej, codziennym podawaniem badanych substancji w wodzie pitnej, okresowym wykonywaniem pomiarów w klatkach metabolicznych, mierzeniem ciśnienia tętniczego metodą bezkrwawą na tętnicy ogonowej oraz pobieraniem krwi w celu oznaczeń osoczonego stężenia jonów sodowych, a także przeprowadzanie chirurgicznej nefrektomii, izolacji i następnie badanie reaktywności naczyń tętniczych z dwóch odmiennych łożysk naczyniowych - mózgowego i mięśniowego. Odpowiedź naczyniowa badana była *ex vivo* w układzie perfuzyjnym, w którym podawane były substancje wazoaktywne - agonista receptora AT1 dla angiotensyny, endotelina-1, acetylocholina, ATP, L-NAME (inhibitor syntazy tlenu azotu). W opisie metodycznym pracy nie znalazłem jednak informacji jaka substancja była użyta jako selektywny agonista receptora AT1 dla angiotensyny, jak również dodatkowych szczegółów dotyczących warunków utrzymania zwierząt, producentów substancji użytych m.in. do przygotowania płynów perfuzyjnych, czy do badania reaktywności naczyń. W pracy nie znalazłem też informacji czym było podyktowane



użycie różnych substancji do badania funkcji rozkurczowej tętnicy obwodowej, gdzie zastosowano typowo acetylocholinę, oraz tętnicy mózgowej, gdzie użyte było ATP.

Protokół doświadczeń jest dobrze przemyślany i odpowiedni do realizacji celów określonych w pracy. W ramach doświadczeń Doktorantka utworzyła łącznie cztery grupy szczurów, u których wykonywana była nefrektomia lub operacja pozorowana oraz które otrzymywały dietę normo- lub wysokosodową. W kolejnym etapie badała efekt hipotensyjny i reaktywność naczyniową zależną od dawki enalaprylu i chymostatyny u szczurów z nadciśnieniem tętniczym indukowanym dietą wysokosodową po jednostronnym usunięciu nerki. Łącznie Doktorantka uzyskała żywotne naczynia i wykonała pomiary *ex vivo* na ponad 270 preparatach naczyń tętnicznych. Liczba pomiarów oraz wybrany model doświadczalny z przewlekłą obserwacją zwierząt świadczą o olbrzymiej pracy włożonej w przeprowadzenie projektu. Należy podkreślić, że przeprowadzenie opisywanych badań wymagało też dużej zręczności i precyzji mikrochirurgicznej. W mojej ocenie bardzo wartościowym elementem pracy jest zbadanie dwóch różnych tętnic. Tętnice w różnych obszarach łożyska naczyniowego mają odmienne właściwości; tętnica środkowa mózgu charakteryzuje się zmianami oporu umożliwiającymi utrzymanie względnie stałego i wysokiego przepływu krwi, natomiast tętnice zaopatrującej mięśnie szkieletowe charakteryzującej się dużą zmiennością przepływu i wytwarzaniem wysokiego oporu zależnie od stanu czynnościowego i pobudzenia współczulnego. Zbadanie dwóch tętnic o odmiennych właściwościach u tych samych zwierząt jest ważnym walorem recenzowanej pracy, gdyż pozwala na ocenę wpływu badanych czynników na naczynia tętnicze o różnej funkcji i znaczeniu dla patofizjologii nadciśnienia tętniczego, w szczególności na naczynia związane z całkowitym oporem naczyniowym i naczynia regulujące przepływ mózgowy i związane z incydentami mózgowo-naczyniowymi - jednym z kluczowych powikłań nadciśnienia tętniczego.

W ramach badań zawartych w pracy Doktorantka oznaczyła również stężenie osoczowe jonów sodowych, angiotensyny II, stężenie azotynów i symetrycznej dimetyloargininy (ADMA) jako wyznacznik metabolizmu tlenu azotu, metabolitów mikrobioty jelitowej - trimetyloaminy i (TMA) i jej tlenu (TMAO), a także syndekanu-1 jako wykładnika stanu glikokaliksu śródbłonna. Oznaczenia wykonane były we współpracy z Zakładem Neuroendokrynologii Klinicznej Centrum Medycznego Kształcenia Podyplomowego (CMKP) w Warszawie, z Zakładem Fizjologii Klinicznej CMKP oraz z Zakładem Fizjologii i Patofizjologii

Eksperymentalnej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego, co świadczy o umiejętności współpracy z zewnętrznymi ośrodkami i dobrze rokuje dla dalszej kariery badawczej Doktorantki.

Uzyskane w pracy wyniki są w mojej ocenie niezmiernie ciekawe i wskazują na odmienne procesy zachodzące pod wpływem diety wysokosodowej i nadciśnienia tętniczego w naczyniach oporowych mięśnia szkieletowego oraz w naczyniach mózgowych oraz, że hamowanie konwertazy angiotensyny, szczególnie w miejscowo w tkankach, istotnie redukuje nie tylko ciśnienie tętnicze, ale również poprawia reaktywność rozkurczową naczyń na badane śródbłonkozależne substancje naczyniorozszerzające z wyjątkiem tlenu azotu. Ponadto nasilona dieta wysokosodową odpowiedź skurczowa tętnicy obwodowej ulega normalizacji pod wpływem hamowanie tkankowej konwertazy angiotensyny. Co istotne, obserwowany wpływ diety wysokosodowej na ciśnienie tętnicze i funkcje naczyń nie wynika bezpośrednio ze wzrostu stężenia jonów sodowych, które było podobne u wszystkich zwierząt niezależnie od przydzielenia do grup doświadczalnych. Ocena innych parametrów biochemicznych w osoczu wskazuje na oczekiwane obniżenie stężenia angiotensyny II u zwierząt na diecie wysokosodowej, a także na zmniejszenie dostępności tlenu azotu i zmiany w glikokaliksie śródbłonka naczyniowego. Przeprowadzone przez Doktorantkę porównanie skuteczności enalaprylu i chymostatyny w obniżaniu ciśnienia tętniczego (jego wartości rozkurczowej) z wykorzystaniem określenia połowy maksymalnego stężenia hamującego (IC50) powinno być przeprowadzone dla dawek wyrażonych w molach, a nie gramach. Dopiero wówczas możliwe jest określenie, czy dana substancja wykazuje większą skuteczność.

Podsumowując, w mojej opinii szczególnie ciekawe jest stwierdzenie przez Doktorantkę w oparciu o uzyskane wyniki, że już samo zwiększenie przyjmowania jonów sodowych bez rozwoju nadciśnienia tętniczego zaburza czynność naczyń mózgowych. Wynik ten wydaje się szczególnie istotny dla dalszej oceny tego zjawiska u ludzi, ze względu na powszechnie stosowaną dietę wysokosodową oraz silny związek pomiędzy zapadalnością na otępienie i udar mózgu, a występowaniem nadciśnienia tętniczego w populacji osób dorosłych.

Dyskusja zawiera szczegółową analizę i interpretację uzyskanych wyników oraz ustosunkowanie się do piśmiennictwa naukowego. Ze względu na złożony protokół badawczy, a także pomiar wielu parametrów hemodynamicznych, naczyniowych i biochemicznych, dyskusja takiego materiału wymaga szerokiego i wielowątkowego spojrzenia na otrzymane



wyniki. Doktorantka sprawnie wywiązała się z tego zadania i dyskusję czyta się z przyjemnością. Pewien niedosyt zostawia brak omówienia ograniczeń pracy, w szczególności ograniczeń samego modelu pomiarów *ex vivo*, pomiaru ciśnienia tętniczego w warunkach unieruchomienia bez oceny przekroju dobowego ciśnienia.

Moja ocena ogólna przedstawionej pracy doktorskiej przez Panią Anetę M. Sawicką jest wysoka. Tematyka pracy doktorskiej jest istotna zarówno poznawczo, jak i klinicznie. Przeprowadzone doświadczenia wniosły istotną nową wiedzę dotyczącą patofizjologii nadciśnienia tętniczego. Zaplanowanie i przeprowadzenie opisanych doświadczeń wymagało nie tylko mozolnej i długotrwałej pracy w laboratorium, ale również dużych zdolności manualnych i precyzji w wykonywaniu zabiegów i izolacji anatomicznie niedużych tętnic u szczura. Uzyskana przez Doktorantkę wyniki są bardzo ciekawe i wskazują na zróżnicowaną odpowiedź na dietę wysokosodową i hamowanie konwertazy angiotensyny pomiędzy naczyń tętnicznych mózgowych i mięśniowymi oraz w zależności o wpływu na układ osoczowy i układ tkankowy renina-angiotensyna.

Lektura tej ciekawej pracy o potencjalnie ważnym znaczeniu klinicznym nasuwa kilka pytań do Doktorantki:

1. Dlaczego wybrana została chymostatyna jako inhibitor tkankowej konwertazy angiotensyny? Obecnie istnieje szereg inhibitorów ACE o udokumentowanym silnym działaniu na lokalne, tkankowe układy renina-angiotensyn (np. chinapryl czy ramipryl), a które są zarejestrowane do leczenia ludzi i zwierząt?
2. Zarejestrowanych jest kilkanaście różnych inhibitorów konwertazy angiotensyny w terapii chorób sercowo-naczyniowych. Ich profile farmakologiczne różnią się istotnie między sobą. Czym był podyktowany wybór enalaprylu?
3. Będę wdzięczny za wyjaśnienie pochodzenia selektywnego antagonisty receptora AT1 oraz ustosunkowanie się do wcześniej sygnalizowanego pytania o przesłanki do użycia acetylocholinylu i ATP odpowiednio do zbadania rozkurczu tętnicy mięśnia smukłego i tętnicy środkowej mózgu.

**Podsumowanie:**

Stwierdzam, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska Pani magister farmacji Anety M. Sawickiej p.t.: „Udział zmian naczyniowych w rozwoju sodo-zależnego nadciśnienia tętniczego. Porównanie skuteczności inhibitorów lokalnego i osoczowego układu renina-angiotensyna w leczeniu tego typu nadciśnienia” prezentuje wysoki poziom naukowy i **spełnia kryteria prac doktorskich** określone w Art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. nr 65, z późn. zm.), w związku z Art. 179 ust. 1 Ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018 r., z późn.zm.).

Z pełnym przekonaniem zwracam się do Rady Naukowej Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. Mirosława Mossakowskiego PAN o dopuszczenie Pani mgr. farm. Anety M. Sawickiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Dr hab. n. med. i n. o zdr. Tymoteusz Żera

