



UNIWERSYTET
MEDYCZNY
W ŁODZI

Załącznik nr 2

Autoreferat

Magdalena Jasińska-Stroschein

Łódź 2015

Spis treści

1. Ogólna charakterystyka działalności naukowej.....	3
2. Prezentacja osiągnięć stanowiących podstawę habilitacji.....	3
2.1. Wykaz publikacji stanowiących podstawę habilitacji.....	3
2.2. Charakterystyka badań i wyników stanowiących podstawę habilitacji.....	4
2.2.1. Wstęp i cele badań.....	5
2.2.2. Postępy farmakoterapii tętniczego nadciśnienia płucnego	8
2.2.3. Poszukiwanie nowych opcji leczenia tętniczego nadciśnienia płucnego	12
2.2.4. Model nadciśnienia płucnego indukowanego monokrotaliną	17
2.2.5. Uwagi o metodyce badań.....	19
2.2.6. Wyniki badań i dyskusja	21
2.2.7. Podsumowanie osiągnięć stanowiących podstawę habilitacji.....	36
2.2.8. Piśmiennictwo.....	38
3. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych.....	43
4. Omówienie działalności dydaktycznej	47
5. Wykaz skrótów i definicji użytych w Autoreferacie	48

1. Ogólna charakterystyka działalności naukowej

1.1. Imię i nazwisko

Magdalena Jasińska-Stroschein

1.2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe- z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej

07.09.2001	Dyplom magistra farmacji, Akademia Medyczna w Łodzi, Wydział Farmaceutyczny, kierunek apteczny (z wynikiem bardzo dobrym)
18.12.2002	Prawo wykonywania zawodu aptekarza wydane przez Okręgową Izbę Aptekarską w Łodzi
27.10.2006	Stopień doktora nauk farmaceutycznych, specjalność farmakologia. Rozprawa doktorska pt. „Wpływ simwastatyny i wybranych antagonistów kanałów wapniowych na mięsień sercowy królików” (Promotor: Prof. dr hab. Daria Orszulak-Michalak). Wydział Farmaceutyczny Uniwersytetu Medycznego w Łodzi.

1.3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

01.03.2003 – 30.06.2008	asystent w Zakładzie Biofarmacji, Katedry Biofarmacji Wydziału Farmaceutycznego, Uniwersytetu Medycznego w Łodzi
od 07.01.2008	adiunkt w Zakładzie Biofarmacji, Katedry Biofarmacji Wydziału Farmaceutycznego, Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

2. Prezentacja osiągnięć stanowiących podstawę habilitacji - wynikających z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2003 nr 65, poz. 595 z późn. zm.)

a) tytuł osiągnięcia naukowego/artystycznego; cykl prac:

Ocena wybranych interakcji lekowych związanych ze szlakami sygnałowymi PDGF i ROCK w badaniach hemodynamicznych na zwierzęcym modelu nadciśnienia płucnego.

Badania wchodzące w zakres osiągnięcia naukowego stanowią przedstawiony cykl sześciu prac oryginalnych i dwóch poglądowych. We wszystkich pracach jestem pierwszym autorem. Łączna wartość współczynnika *impact factor* (IF) dla prezentowanego cyklu prac wynosi 13,7; punktacja Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego (MNiSW): 160 punktów.

2.1. Wykaz publikacji stanowiących podstawę habilitacji (autor/autorzy, tytuł/tytuły publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa)

P-1 Jasińska-Stroschein M, Orszulak-Michalak D.: The current approach into signaling pathways in pulmonary arterial hypertension and their implication in novel therapeutic strategies. *Pharmacol Rep.* 2014, 66, 552-64.

IF₂₀₁₃= 2,165 /MNiSW: 25

P-2 Jasińska M, Owczarek J, Orszulak-Michalak D.: Statins: a new insight into their mechanisms of action and consequent pleiotropic effects. *Pharmacol Rep.* 2007, 59, 483-99.

IF₂₀₀₇= 2,29 /MNiSW: 10

P-3 Jasińska-Stroschein M, Owczarek J, Wesołowska A, Orszulak-Michalak D.: Rosuvastatin, sildenafil and their combination in monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rat. *Acta Pharm.* 2014, 64, 345-54.

IF₂₀₁₃= 1,025 /MNiSW: 20

P-4 Jasińska-Stroschein M, Owczarek J, Łuczak A, Orszulak-Michalak D.: The Beneficial Impact of Fasudil and Sildenafil on Monocrotaline-Induced Pulmonary Hypertension in Rats: A Hemodynamic and Biochemical Study. *Pharmacology* 2013, 91, 178–84.

IF₂₀₁₃= 1,581 /MNiSW: 20

P-5 Jasińska-Stroschein M, Owczarek J, Plichta P, Orszulak-Michalak D.: Concurrent Rho-Kinase and Tyrosine Kinase Platelet-Derived Growth Factor Inhibition in Experimental Pulmonary Hypertension. *Pharmacology* 2014, 93, 145-50.

IF₂₀₁₃= 1,581 /MNiSW: 20

P-6 Jasińska-Stroschein M, Owczarek J, Sołtysiak U, Orszulak-Michalak D.: Rosuvastatin intensifies the beneficial effects of Rho-kinase inhibitor in reversal of monocrotaline-induced pulmonary hypertension *Arch Med Sci.* DOI: 10.5114/aoms.2015.49740

IF₂₀₁₃= 1,890 /MNiSW: 25

P-7 Jasińska-Stroschein M, Owczarek J, Surowiecka A, Kącikowska J, Orszulak-Michalak D.: HMG-CoA reductase inhibitors: an opportunity for the improvement of imatinib safety. An experimental study in rat pulmonary hypertension. *Pharmacol Rep.* 2015, 67, 32-7.

IF₂₀₁₃= 2,165 /MNiSW: 25

P-8 Jasińska-Stroschein M, Owczarek J, Cicha K, Orszulak-Michalak D: The influence of imatinib at a low dose and sildenafil on pulmonary hypertension in rats. *Pharmazie* DOI: 10.1691/ph.2015.4891.

IF₂₀₁₃= 1,003 /MNiSW: 15

2.2. Charakterystyka badań i wyników stanowiących podstawę habilitacji

Konstrukcja pracy

W Autoreferacie, po przedstawieniu celów badawczych (**Wstęp i cele badań**), scharakteryzowałam problematykę farmakoterapii nadciśnienia płucnego (PH) i kierunki poszukiwania nowych opcji terapeutycznych. Uwzględniłam mechanizmy działania i rolę w rozwoju schorzenia związków/leków będących przedmiotem eksperymentów opisanych w Autoreferacie. Wymieniłam najważniejsze

metody badawcze stosowane w opisanych przeze mnie badaniach. W dalszej części (**Wyniki badań i dyskusja**) omówiłam uzyskane wyniki stanowiące podstawę habilitacji odnosząc się do postawionych przeze mnie hipotez (*główne hipotezy badawcze i wnioski*) a także wyników innych badaczy. W prezentacji wyników uwzględniłam podział na cztery etapy badawcze, których cele przedstawiłam we **Wstępie** pracy. Przedyskutowałam potencjalne znaczenie kliniczne otrzymanych przeze mnie wyników badań. Dla zachowania lepszej przejrzystości, w tej części pracy odnosiłam się do omówionych wcześniej mechanizmów działania związków wykorzystanych w badaniach. Do najważniejszych wniosków z przeprowadzonych prac eksperymentalnych odniosłam się w **Podsumowaniu**.

2.2.1. Wstęp i cele badań

Ostatnie dwie dekady przyniosły rosnące zainteresowanie chorobami naczyń płucnych, w szczególności – nadciśnieniem płucnym. Nadciśnienie płucne (PH, ang. pulmonary hypertension) to stan patofizjologiczny, w którym średnie ciśnienie w tętnicy płucnej przekracza 25 mmHg w spoczynku lub 30 mmHg podczas wysiłku. Szczególną populację stanowią pacjenci z tętniczym nadciśnieniem płucnym (PAH, ang. pulmonary arterial hypertension). Tętnicze nadciśnienie płucne należy do grupy chorób rzadkich. W Europie stwierdza się je średnio u 12-50 osób/milion, w Polsce obecnie na tętnicze nadciśnienie płucne cierpi 667 pacjentów a zapadalność wynosi 3,7/mln/rok (Kurzyńska M, 4. Ogólnopolska Konferencja Nadciśnienia płucnego, 2014).

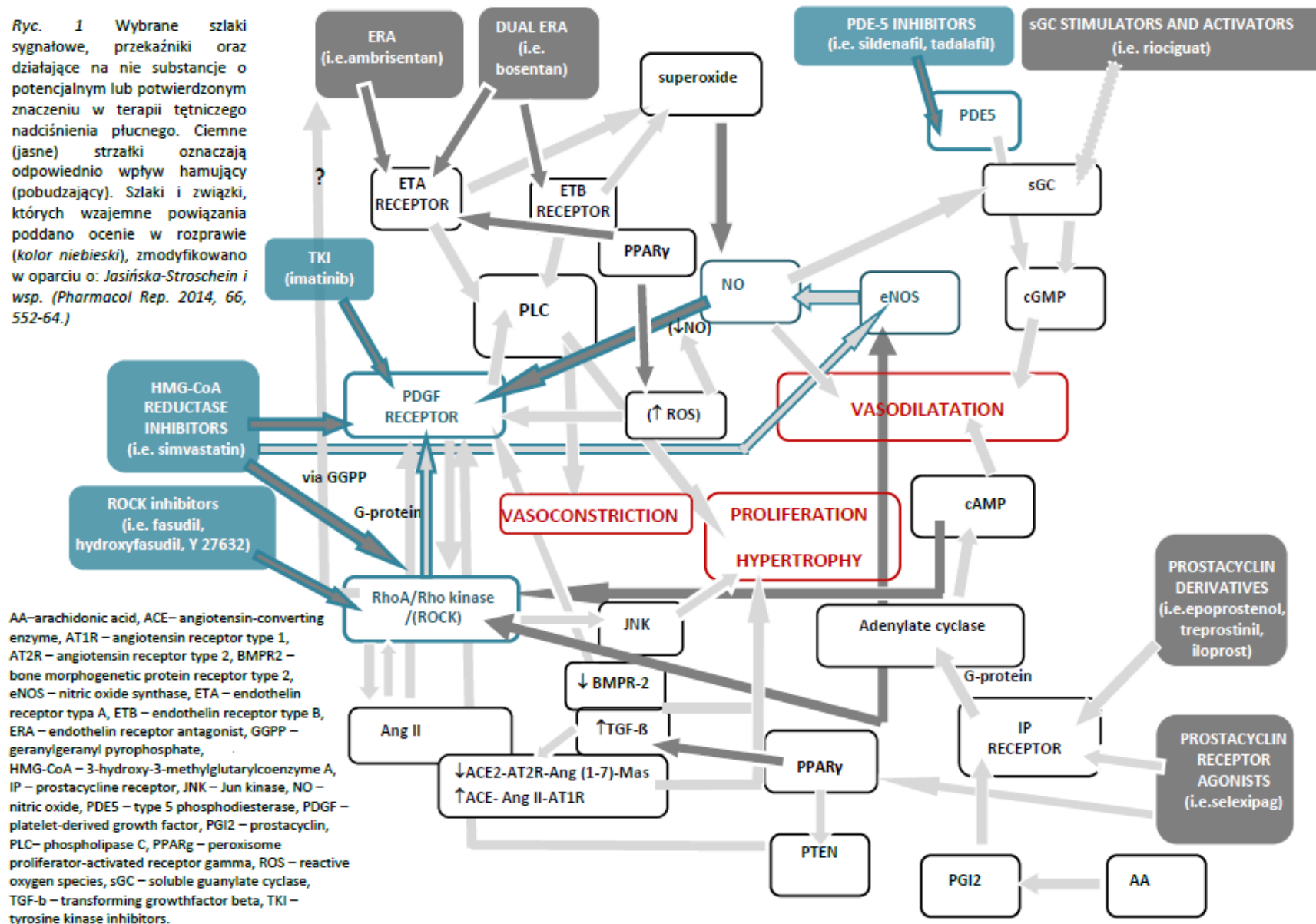
Coraz większe zainteresowanie tą jednostką chorobową, wraz z lepszym zrozumieniem jej patogenezы, zaowocowało znacznym postępowaniem farmakoterapii PH. Obecnie, leki dostępne w ramach nowoczesnej farmakoterapii, tzw. celowanej, łagodzą objawy kliniczne, poprawiają jakość życia chorych oraz wydłużają czas przeżycia. Nie zapewniają jednak długotrwałej normalizacji powstałych oporów płucnych i nie pozwalają na pełne wyleczenie. Prawdopodobnie tłumaczy to fakt, że w rozwoju PAH dochodzi do zaburzenia przekazywania w obrębie szeregu szlaków sygnałowych a stosowane leki celowane mogą nie zapewnić pełnego odwrócenia uwarunkowanych nimi zmian. Dlatego poszukuje się nowych związków działających na szlaki sygnałowe o udokumentowanej roli w patomechanizmie choroby, jak i nowych punktów uchwytu oraz związanych z nimi substancji o potencjalnej efektywności terapeutycznej. Inne pytania badawcze dotyczą efektywnych i bezpiecznych skojarzeń lekowych obejmujących więcej niż jedną klasę leków swoistych dla PAH ale o różnych punktach uchwytu. Opisane poszukiwania utrudnia sama etiologia choroby, która jest wieloczynnikowa i obejmuje liczne, wzajemnie powiązane szlaki biochemiczne. Dlatego, poparte badaniami na poziomie molekularnym, potencjalne korzyści wynikające z takich powiązań nie zawsze znajdują odzwierciedlenie w późniejszych badaniach eksperymentalnych lub klinicznych.

Wśród zainteresowań naukowców prowadzących badania nad patomechanizmem schorzenia znalazły się szlaki: płytkopochodnego czynnika wzrostu (PDGF, ang. platelet - derived growth factor) oraz RhoA i jej kinaz, a ich inhibitory stały się przedmiotem badań przedstawionych w Autoreferacie. W świetle doniesień o wzajemnym powiązaniu ww. szlaków postanowiłam ocenić na zwierzęcym modelu nadciśnienia płucnego efekty łącznego stosowania związków działających na przekąźnictwo związane z PDGF oraz ROCK. Takiej ocenie poddałam związki z grup inhibitorów: kinazy tyrozynowej (imatynib), kinazy ROCK (fasudil, statyny) oraz fosfodiesterazy typu 5 (syldenafil). Na rycinie 1 przedstawiłam schematycznie najważniejsze szlaki sygnałowe, przekąźniki oraz działające na nie substancje o potencjalnym lub potwierdzonym znaczeniu w terapii tętniczego nadciśnienia płucnego. Uwzględniłam (*kolor niebieski*) szlaki i związki, których wzajemne powiązania poddałam ocenie w przedstawionych badaniach.

Główne cele moich badań obejmowały:

1. Wybór potencjalnych skojarzeń lekowych do dalszej oceny eksperymentalnej w oparciu o dotychczas opisane na poziomie molekularnym wzajemne oddziaływania szlaków/przekąźników oraz substancji stosowanych dla odwrócenia patologicznych zmian powstających w przebiegu nadciśnienia płucnego (**etap wstępny**).
2. Wybór odpowiedniego modelu eksperymentalnego do weryfikacji postawionych następnie hipotez badawczych, w tym potwierdzenie słuszności wydłużenia czasu indukcji nadciśnienia płucnego (**etap I i II**).
3. Ocenę efektów terapii skojarzonej z udziałem leku celowanego – sildenafilu (PDE-5i) oraz inhibitorów szlaku RhoA/ROCK (fasudil, rozuwastatyna), ze szczególnym uwzględnieniem poprawy hemodynamiki i ograniczenia przerostu prawej komory mięśnia sercowego (**etap I**).
4. Potwierdzenie, opisanego badaniami *in vitro*, wpływu hamowania szlaku PDGF przez inhibitory ROCK na odwrócenie patologicznych zmian w rozwoju nadciśnienia płucnego. Ocenę efektów terapii skojarzonej obejmującej inhibitory PDGF (imatynib) oraz ROCK (fasudil) (**etap II**).
5. Ocenę efektów skojarzeń lekowych z udziałem inhibitora reduktazy HMG-CoA jako czynnika wzmacniającego efekt blokady szlaków ROCK oraz PDGF (**etap II i III**).
6. Odpowiedź na pytanie czy włączenie leków o potencjalnym wpływie hamującym na przekąźnictwo PDGF zapewni zachowanie korzystnych efektów imatynibu (odwrócenie patologicznych zmian w PH) po obniżeniu jego dawki. Ocenę efektów terapii skojarzonej obejmującej inhibitory PDGF (imatynib) w niskiej dawce oraz wybrane statyny (simwastatyna, rozuwastatyna) lub inhibitory PDE-5 (sildenafil) (**etap III**).

Ryc. 1 Wybrane szlaki sygnałowe, przekaźniki oraz działające na nie substancje o potencjalnym lub potwierdzonym znaczeniu w terapii tętniczego nadciśnienia płucnego. Ciemne (jasne) strzałki oznaczają odpowiednio wpływ hamujący (pobudzający). Szlaki i związki, których wzajemne powiązania poddano ocenie w rozprawie (kolor niebieski), zmodyfikowano w oparciu o: Jasińska-Stroschein i wsp. (Pharmacol Rep. 2014, 66, 552-64.)

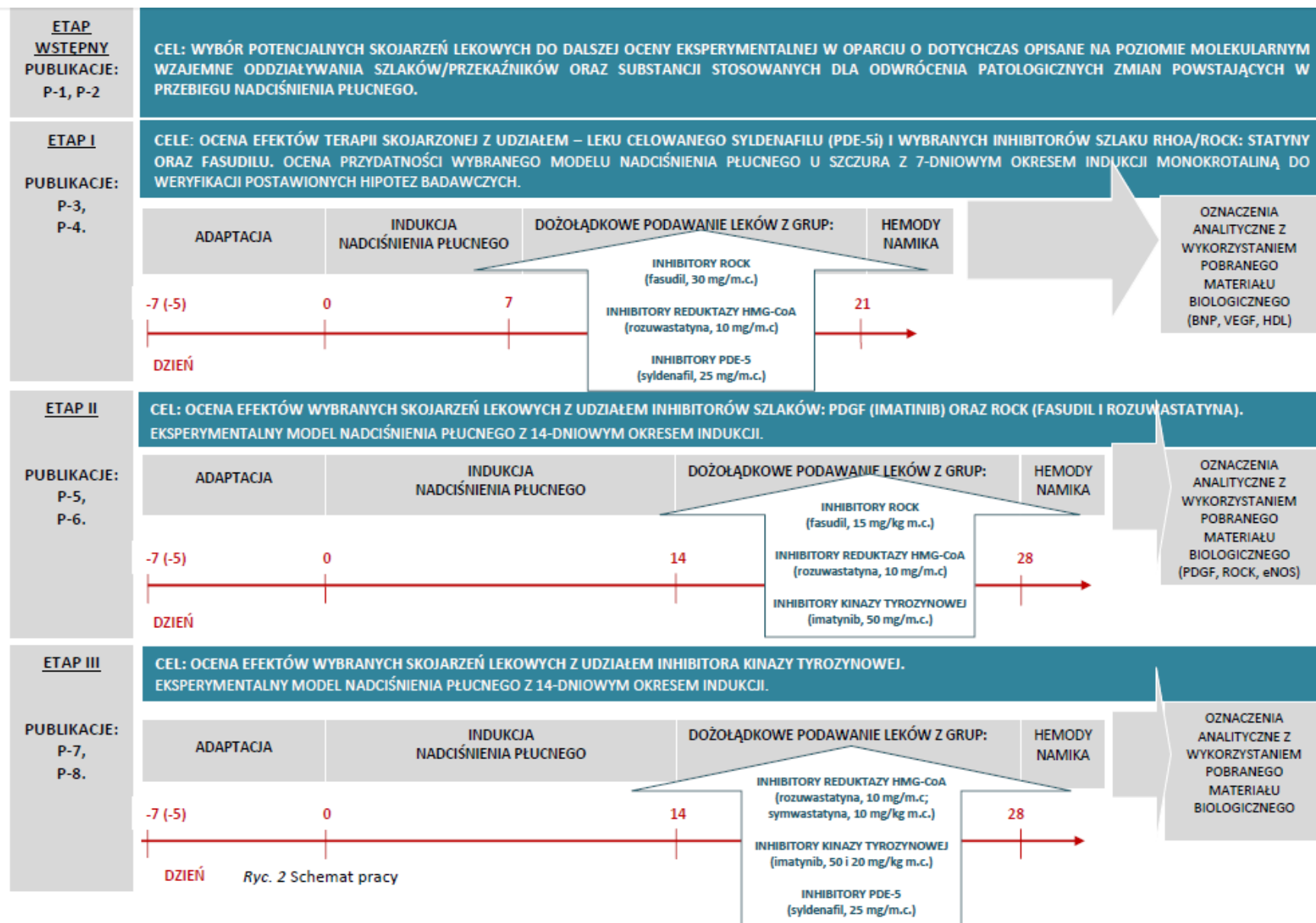


Powyższe cele zrealizowałam w czterech etapach. Kierunki badawcze podjęte w każdym z etapów przedstawiłam schematycznie na rycinie 2. Uwzględniłam grupy testowanych związków/leków, wielkości dawek, wykorzystany model doświadczalny oraz publikacje powstałe w wyniku realizacji ww. etapów.

2.2.2. Postępy farmakoterapii tętniczego nadciśnienia płucnego

Tętnicze nadciśnienie płucne obejmuje postacie choroby o zróżnicowanej etiologii (Simoneau i wsp. 2013). W przebiegu PAH dochodzi do dysfunkcji śródbłonna z zaburzeniem równowagi pomiędzy mechanizmami o charakterze wazodylatacyjnym, antymitotycznym i antyproliferacyjnym z udziałem tlenku azotu (NO, ang. nitric oxide) i prostacykliny (PGI₂), a czynnikami wykazującymi właściwości prozapalne, mitogenne i wazokonstrykcyjne: endoteliną 1 (ET-1) oraz tromboksanem A₂ (TXA₂). Jednocześnie pojawiają się zmiany o charakterze prozakrzepowym, co skutkuje powstawaniem skrzepin w obrębie tętnic płucnych. Istotnym dla rozwoju PAH jest remodeling naczyń płucnych. Proces ten zachodzi w obrębie fibroblastów, komórek śródbłonna i mięśni gładkich a towarzyszy mu akumulacja składników macierzy zewnątrzkomórkowej: kolagenu, elastyny, fibronektyny i innych. Do tych niekorzystnych zmian dochodzi w następstwie zaburzonej homeostazy z przewagą proliferacji a zahamowaniem apoptozy komórek ścian naczyń (Humbert i wsp. 2004; Morrell i wsp. 2009). Wskazuje się także na podłoże immunologiczne zmian w PAH (Kopeć i Podolec 2015). W zaawansowanym stadium choroby dochodzi do zwłóknienia błony wewnętrznej, przerostu mięśniówki i przydanki naczyń oraz pojawienia się zmian nieodwracalnych, tzw. splotowatych (ang. plexiform lesion). Są to drobne kanaliki kapilarne tworzące splot naczyń wewnątrz ściany pogrubiałych tętniczek w oskrzelikach lub oskrzelach (Callebert i wsp. 2006; Pietra i wsp. 2004). Opisane zmiany prowadzą do zwiększenia oporów w patologicznie zmienionych naczyniach oraz, w konsekwencji, do podwyższenia ciśnienia w tętnicy płucnej, przerostu prawej komory serca i rozwoju prawokomorowej niewydolności serca.

Obecnie obserwuje się znaczący postęp w leczeniu farmakologicznym PAH. Dostępne trzy klasy leków zapewniających tzw. postępowanie celowane (tj. inhibitory fosfodiesterazy typu 5, PDE-5i; analogi prostacykliny; antagoniści receptorów endotelinowych, ERA) łagodzą objawy kliniczne, poprawiają jakość życia chorych oraz wydłużają czas przeżycia. Wprowadzenie ich do standardów leczenia spowodowało obniżenie śmiertelności o 43%, a hospitalizacji – o 61% (Galiè i wsp. 2009). Terapia ww. lekami swoistymi stosowana jest u pacjentów nie odnoszących korzyści z leczenia za pomocą leków z grupy antagonistów kanałów wapniowych rozszerzających naczynia płucne (np. amlodypina) (Galiè i wsp. 2013).



Ryc. 2 Schemat pracy

Antagoniści receptora endotelinowego (ERA)

Endotelina-1 (ET-1) jest jednym z najsilniejszych znanych czynników naczyniokurczących. Ten neurohormon wykazuje także działanie mitogenne i prozapalne; sprzyja zwłóknieniu i rozrostowi komórek oraz przerostowi i przebudowie serca. Ilość ET-1 w tkankach i osoczu ulega zwiększeniu w przebiegu chorób tkanki łącznej, takich jak twardzina układowa i w wielu chorobach sercowo-naczyniowych: ostrej i przewlekłej niewydolności serca, niedokrwieniu mięśnia sercowego, nadciśnieniu tętniczym systemowym i miażdżycy tętnic oraz w tętniczym nadciśnieniu płucnym. Jak wykazano, zwiększone stężenia ET-1 korelują z ciężkością przebiegu tętniczego nadciśnienia płucnego i dalszym rokowaniem. ET-1 poprzez wiązanie z receptorami ETA i ETB, zlokalizowanymi w komórkach mięśni gładkich naczyń, powoduje, zależny od fosfolipazy C (PLC), wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia jonów wapnia i ich skurcz. Pobudzenie receptorów ETB znajdujących się w śródbłonku prowadzi również do uwolnienia substancji wazodylatacyjnych i antyproliferacyjnych (NO i PGI₂), które mogą znosić niekorzystny wpływ endoteliny 1 (Galiè i wsp. 2004). Tym niemniej, leki wybiórczo działające na receptory A i B oraz leki nieselektywnie wiążące się z tymi typami receptorów cechuje najprawdopodobniej zbliżona skuteczność w leczeniu PAH (Galiè i wsp. 2009). Bozentan (FDA, 2001) jest antagonistą receptora endoteliny (ERA, ang. endothelin receptor antagonist) z powinowactwem zarówno do receptorów typu A i B (ETA i ETB). Lek zmniejsza opór naczyniowy zarówno płucny, jak i ogólnoustrojowy, w wyniku czego dochodzi do zwiększenia pojemności minutowej serca, poprawy hemodynamiki i wydolności wysiłkowej oraz poprawy klasy funkcjonalnej. Ambrisentan (FDA, 2007) jest selektywnym antagonistą receptora typu ETA (4000-krotnie większa swoistość w porównaniu do ETB), występującego głównie w komórkach mięśniówki gładkiej naczyń krwionośnych i miocytach mięśnia sercowego (Opitz i wsp. 2008). Przy porównywalnej efektywności terapeutycznej, stosowanie ambrisentanu wiąże się z mniejszym ryzykiem podwyższenia poziomu aminotransferaz i uszkodzenia wątroby. Ostatni lek z tej grupy, macitentan (FDA, 2012) jest silnym antagonistą receptorów endoteliny. Działa on na receptory ETA jak i ETB w komórkach mięśni gładkich tętnic płucnych (100-krotnie większa swoistość w porównaniu do ETB) (Pulido i wsp. 2013). Wszystkie leki z tej grupy są podawane doustnie, a zarejestrowane wskazania obejmują terapię tętniczego nadciśnienia płucnego (II-III WHO-FC), w tym związanego z chorobami tkanki łącznej i wadami serca, oraz terapię tętniczego nadciśnienia płucnego idiopatycznego (bozentan) (Galiè i wsp. 2013).

Inhibitory fosfodiesterazy typu 5 (PDE-5i)

Patologiczne obkurczenie drobnych tętnic płucnych, przerost mięśniówki gładkiej naczyń płucnych, zwłóknienie ścian naczyń oraz proliferacja śródbłonka, mogą być związane z upośledzeniem śródbłonkowego wydzielania tlenku azotu (McLaughlin i wsp. 2006). Powstający w śródbłonku NO wywiera swoje biologiczne działanie przez pobudzenie rozpuszczalnej cyklazy guanylowej (sGC, ang.

soluble guanylate cyclase) (Arnold i wsp. 1977). Dochodzi wówczas do obniżenia wewnątrzkomórkowego stężenia jonów Ca^{2+} , modyfikacji czynności kanałów jonowych oraz pobudzenia/zahamowania fosfodiesteraz (Fedorowicz i wsp. 2005). Fosfodiesteraza typu 5 (PDE-5) jest głównym enzymem z grupy fosfodiesteraz obecnym w naczyniach płucnych. Zahamowanie aktywności PDE-5 zapewnia efekt wazodylatacyjny zależny od cGMP/NO (Francis i wsp. 2010). Dochodzi wówczas do zwiększenia stężenia cyklicznego guanozynomonofosforanu (cGMP), wzmocnienia i wydłużenia działania tlenu azotu, a przez to do rozkurczu mięśni gładkich i rozszerzenia naczyń płucnych. Leki z tej grupy wykazują dodatkowo właściwości antyproliferacyjne (Wharton i wsp. 2005). Ich stosowanie u pacjentów z PAH może to prowadzić do rozszerzenia naczyń płucnych, z niewielkim rozszerzeniem naczyń w krążeniu ogólnym. Substancje z tej grupy posiadają rejestrację w terapii tętniczego nadciśnienia płucnego, w tym związanego z chorobami tkanki łącznej, a także w leczeniu zaburzeń erekcji. Sylденаfil (FDA, 2005) działa selektywnie na PDE-5. Lek wpływa na PDE-5 silniej niż na inne znane fosfodiesterazy (PDE-6, PDE-2, 3). W szczególności, sylденаfil działa ponad 4000 razy bardziej selektywnie na PDE-5 niż na PDE3- izoenzym fosfodiesterazy swoistej względem cAMP i wpływającej na kurczliwość mięśnia sercowego (Cheitlin i wsp. 1999). Sylденаfil wpływa korzystnie na redukcję niekorzystnych objawów w PAH oraz na poprawę wydolności wysiłkowej i parametrów hemodynamicznych. Powoduje obniżenie średniego tętniczego ciśnienia płucnego (mPAP) i naczyniowych oporów płucnych (PVR) oraz zwiększenie pojemności minutowej (CO) (Galiè i wsp. 2005). Tadalafil (FDA, 2009) cechuje dłuższy w porównaniu do syldenafilu okres półtrwania pozwalający na dawkowanie leku raz na dobę. Riociguat (FDA, 2013) zwiększa poziom cGMP poprzez bezpośrednią stymulację jednego z mediatorów dla tlenu azotu – sGC. Jak wykazano, lek zwiększa aktywność sGC w przypadku obniżenia stężenia NO, a także zwiększa wrażliwość na tlenek azotu pochodzenia endogennego. W efekcie zapewnia on efekt naczynioszerzący, co jest wykorzystywane w terapii PAH oraz przewlekłego zakrzepowo-zatorowego nadciśnienia płucnego (CTEPH, ang. Chronic Thromboembolic Pulmonary Hypertension) (Galiè i wsp. 2013).

Analogi prostacykliny (prostanoidy)

Prostacyklina (PGI_2) wytwarzana jest z kwasu arachidonowego przy udziale syntazy prostacykliny (PGIS). Wewnątrzkomórkowy mechanizm działania prostacykliny jest uwarunkowany wzrostem stężenia cAMP w komórkach docelowych (Mubarak i wsp. 2010). Obok silnego efektu przeciwpłytkowego PGI_2 wpływa na rozszerzenie naczyń płucnych oraz działa antyproliferacyjnie i cytoprotekcyjnie na komórki śródbłonna, dzięki czemu przeciwdziała aktywacji zapalnej śródbłonna i rozwojowi jego dysfunkcji. W nadciśnieniu płucnym obserwuje się podwyższenie poziomu rozpuszczalnej selektyny P i czynnika von Willebranda oraz obniżenie poziomu trombomoduliny

(Olschewski i wsp. 2004; Fedorowicz i wsp. 2005). Prostacyklina podana dożylnie zmniejsza stężenie rozpuszczalnej selektyny P oraz podnosi poziom trombomoduliny u pacjentów z nadciśnieniem płucnym. U pacjentów z PAH dochodzi do zmniejszenia ekspresji syntazy prostacykliny i w następstwie do zmniejszenia stężenia endogennej PGI₂. W dysfunkcji śródbłonna płucnego upośledzenie aktywności biologicznej PGI₂ może być związane z zaburzeniem szlaku NO. W zapobieganiu skutkom niedoborów PGI₂ zastosowanie znalazły jej analogi, do których należą: epoprostenol, iloprost, treprostynil i beraprost. Przy zróżnicowanym profilu farmakokinetycznym i właściwościach fizykochemicznych determinujących drogę podawania, substancje z tej grupy cechuje podobna efektywność terapeutyczna. Epoprostenol (FDA, 1995) - syntetyczna prostacyklina, z uwagi krótki okres półtrwania (3-5 min) i brak stabilności, podawana jest w ciągłym wlewie dożylnym. Dzięki lepszej stabilności, analog epoprostenolu – treprostynil (FDA, 2002) może być podawany również podskórnie a iloprost (FDA, 2003) – wziewnie (Galiè i wsp. 2009). Ostatnio zarejestrowany selexipag (FDA, 2014) jest doustnym agonistą receptora prostacykliny (IP). Prostanoidy odznaczają się dużą efektywnością terapeutyczną. Poprzez wpływ na poprawę wydolności wysiłkowej, parametrów hemodynamicznych oraz na zmniejszenie częstości zaostrzeń choroby znalazły one zastosowanie w terapii zaawansowanych postaci schorzenia (III-IV WHO-FC). Ograniczeniem stosowania tej grupy leków celowanych mogą być rozwijające się: miejscowy stan zapalny, zakrzepica, bakteriemia, posocznica (epoprostenol), ból w miejscu iniekcji (treprostynil) oraz konieczność częstych inhalacji (iloprost) (Waxman i wsp. 2013).

2.2.3. Poszukiwanie nowych opcji leczenia tętniczego nadciśnienia płucnego

Omówione wyżej grupy terapeutyczne, dostępne w ramach nowoczesnej farmakoterapii celowanej, łagodzą objawy kliniczne, poprawiają jakość życia chorych oraz wydłużają czas przeżycia. Nie zapewniają długotrwałej normalizacji powstałych oporów płucnych i nie pozwalają na pełne wyleczenie. Może wynikać to z faktu, że w rozwoju PAH dochodzi do zaburzenia przekąźnictwa w obrębie szeregu szlaków sygnałowych a zastosowana farmakoterapia celowana nie zapewnia pełnego odwrócenia uwarunkowanych nimi zmian. Niektórzy autorzy zwracają uwagę na niewielki wpływ omawianych wyżej grup terapeutycznych na hamowanie remodelingu w obrębie naczyń płucnych przy ich znacznej komponentie naczynioszerzającej (Duong-Quy i wsp. 2013). Coraz lepsza znajomość patomechanizmów odpowiedzialnych za rozwój choroby umożliwia jednak optymalizację dotychczasowej farmakoterapii. Poszukuje się nowych leków działających na szlaki sygnałowe, których udział w rozwoju schorzenia jest już dobrze znany, tj. substancji związanych z tlenkiem azotu, prostacykliną oraz endoteliną, a przykładem są ostatnio zarejestrowane tadalafil, selexipag, riociguat i macitentan.

Wyrazem wdrażania nowych opcji terapeutycznych jest stosowanie leczenia skojarzonego z wykorzystaniem substancji o już udokumentowanej skuteczności w terapii PAH. W ramach terapii skojarzonej stosuje się jednocześnie więcej niż jedną klasę leków swoistych dla PAH. Przy braku efektywności klinicznej takiego postępowania (np. badania STEP-1, COMBI), inne próby kliniczne wskazują na korzyści związane z uzyskaniem lepszych parametrów hemodynamicznych lub poprawy wydolności wysiłkowej przy łączeniu PGI₂ z ERA (badanie BREATHE-2) lub z PDE-5i (badanie TRIUMPH) a także PDE-5i z ERA (badanie PAES) (Galiè i wsp. 2009). Jedno z ostatnich randomizowanych kontrolowanych badań klinicznych potwierdziło korzyści terapii sekwencyjnej, uwarunkowanej reakcją na pierwszy lek (badanie AMBITION) (ERS International Congress, 2014). Zwraca się jednak uwagę na brak długoterminowych badań potwierdzających efektywność i bezpieczeństwo wybranych skojarzeń lekowych. Inne poruszane kwestie dotyczą odpowiedniego doboru leków, optymalnego czasu ich podawania, konieczności indywidualnej oceny wskazań do podjęcia takiej terapii oraz ryzyka interakcji lekowych. Tym niemniej, terapia skojarzona oparta na łączeniu dowolnych dwóch z trzech grup leków celowanych staje się standardem postępowania farmakoterapeutycznego szczególnie u pacjentów nie odpowiadających na monoterapię oraz w zaawansowanym stadium choroby (WHO-FC IV) (Galiè i wsp. 2013). Poszukiwania nowych opcji leczenia PAH obejmują również nowe punkty uchwytu i nowe substancje o potencjalnej efektywności terapeutycznej. Wśród zainteresowań badaczy znalazły się m.in. substancje związane z przekąźnictwem serotoninerгіcznym (antagoniści receptora serotoninowego, 5-HT) (Kloza i wsp. 2014), beta-adrenergicznym (selektywni i nieselektywni antagoniści), układem renina-angiotensyna-aldosteron (RAAS) (antagoniści aldosteronu, receptora wazopresyny), bądź z pobudzeniem receptorów aktywowanych proliferatorami peroksyosomów (PPAR, ang. peroxisome proliferator-activated receptors). Wskazuje się na potencjalne korzyści zastosowania komórek macierzystych czy terapii genowej (Gomberg-Maitland i wsp. 2013). Prowadzone są także badania nad udziałem w patomechanizmie PAH szlaku płytkopochodnego czynnika wzrostu oraz szlaku RhoA i jej kinaz, a ich inhibitory, stały się przedmiotem moich poszukiwań badawczych opisanych w Autoreferacie.

Inhibitory kinazy tyrozynowej (TKI)

Wprowadzenie substancji z grupy TKI (ang. tyrosine kinase inhibitors) (imatynib, nilotynib, sorafenib) określa się mianem „kamienia milowego” w terapii nowotworów. Znalazły one zastosowanie w terapii m.in. ostrych i przewlekłych białaczek szpikowych. Mechanizm działania TKI opiera się silnym hamowaniu aktywności kinaz tyrozynowych (TK) Bcr-Abl oraz wielu receptorów kinaz tyrozynowych: Kit, receptora czynnika wzrostu komórek macierzystych (SCF) kodowanego przez protoonkogen c-Kit oraz receptorów naskórkowego i płytkopochodnego czynnika wzrostu (PDGFR

alfa i beta). Imatynib może również hamować procesy komórkowe, w aktywacji których pośredniczą wymienione receptory kinaz. Kinazy tyrozynowe w komórkach nowotworowych wykazują nadmierną aktywność, a warunkują one jedną z ważniejszych potranslacyjnych modyfikacji, jaką jest fosforylacja białek. Proces fosforylacji wpływa na wiele mechanizmów regulatorowych kontrolujących procesy wzrostu, różnicowania, proliferacji i apoptozy komórek. Receptory kinaz tyrozynowych (RTK, ang. receptor tyrosine kinase) jako transbłonowe glikoproteiny łączą się z czynnikami wzrostu i innymi zewnątrzkomórkowymi cząsteczkami sygnałowymi. Analogicznie do zmian zachodzących w procesie nowotworzenia, w rozwoju tętniczego nadciśnienia płucnego dochodzi do proliferacji w obrębie komórek mięśni gładkich tętnicy płucnej (PASMC, ang. pulmonary artery smooth muscle cell) i remodelingu naczyniowego związanego z aktywacją kaskady kinaz (Moreno-Vinasco i wsp. 2010). Inhibitory kinazy tyrozynowej zapobiegają aktywacji RTK na drodze antagonizmu konkurencyjnego w stosunku do domeny odpowiedzialnej za wiązanie ATP. Dzięki temu receptory, których zwiększoną aktywność zaobserwowano zarówno w przebiegu rozwoju procesu nowotworowego, jak i w przypadku tętniczego nadciśnienia płucnego, mogą zostać zablokowane. Przebudowa naczyń krwionośnych w PAH istotnie związana jest z procesami migracji oraz proliferacji komórek śródbłonna i mięśni gładkich. TKI hamują ww. procesy, a ponadto działają proapoptycznie i naczynioszerząco. Działanie rozkurczające leków tej grupy na mięśnie gładkie naczyń krwionośnych związane jest z zahamowaniem kinaz zależnych od wzrostu komórki. Należy jednak zwrócić uwagę na ryzyko działań niepożądanych związanych ze stosowaniem tzw. inhibitorów wielokinazowych (ang. multikinase inhibitors); wymienia się np. kardiotoksyczność – sorafenib oraz zmniejszenie pojemności minutowej – sorafenib i sunitynib (Gomberg-Maitland i wsp. 2013).

Jak już wspomniano, imatynib powoduje również inhibicję receptorów dla czynników wzrostu zaangażowanych w skurcz komórek, w tym receptora płytkopochodnego czynnika wzrostu – PDGFR (Perros i wsp. 2008). PDGF jest syntetyzowany przez wiele typów komórek, w tym makrofagi, komórki śródbłonna oraz mięśni gładkich tętnicy płucnej. Jako jeden z mediatorów posiada zdolność do indukowania procesów proliferacji i migracji komórek mięśni gładkich oraz fibroblastów. Dlatego też przypisuje się mu kluczową rolę w rozwoju wielu chorób u których podłoża znajdują się procesy fibroproliferacyjne np.: miażdżycy, zwłóknienia płuc oraz nadciśnienia płucnego (Heldin i wsp. 1999). U pacjentów z zaawansowanym PAH może dochodzić do nadekspresji mRNA genów kodujących PDGF i PDGFR w komórkach mięśni gładkich tętnicy płucnej, a badania *in vitro* potwierdziły hamujący wpływ imatynibu na procesy migracji i proliferacji PASMC poprzez blokowanie fosforylacji receptora PDGF beta (Perros i wsp. 2008). Imatynib jest pierwszym z grupy terapeutycznej TKI o korzyściach w terapii PAH popartych badaniami eksperymentalnymi na modelach nadciśnienia płucnego

indukowanego monokrotaliną lub hipoksją (Schermuly i wsp. 2005; Klein i wsp. 2008). Dotyczyły one m.in. redukcji ciśnienia w prawej komorze serca oraz jej przerostu. Próby kliniczne (Ghofrani i wsp. 2010; Patterson i wsp. 2006) wykazały m.in. poprawę wydolności wysiłkowej oraz parametrów hemodynamicznych u pacjentów z PAH. Ostatnie wyniki badań klinicznych potwierdziły dodatkowe efekty wynikające z włączenia imatynibu do celowanej terapii opartej na skojarzeniach dwulekowych: ERA i PDE-5i, ERA i PGI₂, PG i PDE-5i lub trójlekowych: ERA, PDE-5i i PGI₂ (Hoeper i wsp. 2013). W grupie imatynibu obserwowano istotne obniżenie płucnych oporów naczyniowych, ciśnienia w tętnicy płucnej i prawej komorze serca wraz poprawą wydolności wysiłkowej w 6-minutowym teście marszu (6MWD, ang. six-minute walk distance). Jakkolwiek poważne działania niepożądane (m.in. zaburzenia hemolityczne – 14%, krwawienie podtwardówkowe – 4,2% pacjentów) były przyczyną przedwczesnego zakończenia badania u części pacjentów (badanie IMPRES). W konsekwencji podkreśla się konieczność kontynuowania badań nad imatynibem w PAH. Ma to na celu oszacowanie stosunku korzyści do ryzyka stosowania leku w terapii PAH jak i ustalenia optymalnego dawkowania i/lub optymalnych skojarzeń w kierunku poprawy profilu bezpieczeństwa. Pomimo rosnącego zainteresowania zastosowaniem inhibitorów kinazy tyrozynowej w terapii PAH, niewiele doniesień dotyczy potencjalnych korzyści łącznego ich stosowania z innymi lekami o potencjalnej lub udokumentowanej efektywności w omawianej jednostce chorobowej.

Inhibitory kinazy Rho

Ostatnie doniesienia wskazują, że szlak RhoA i jej kinaz może odgrywać znaczącą rolę w patomechanizmie PAH z uwagi na powiązanie tego schorzenia z procesami skurczu i proliferacji komórek mięśni gładkich tętnic płucnych. Białka Rho są małymi GTP-azami, należącymi do nadrodziny białek Ras. Pełnią one główną rolę w przekazywaniu sygnałów wewnątrzkomórkowych i kontroli wielu istotnych procesów komórkowych, takich jak: migracja, transport błonowy, adhezja, polarność czy zmiana kształtu. Białka Rho funkcjonują jako molekularne przełączniki, oscylując między postacią aktywną (związane z GTP) a nieaktywną (związane z GDP). Ich efektem jest kinaza serynowo/treoninowa zależna od Rho (ROCK, ang. Rho-associated kinase). Kinazy Rho-zależne: ROCK-1 (ROCK-β) i ROCK-2 (ROCK-α) powodują zwiększenie wrażliwości na działanie jonów wapnia Ca²⁺ poprzez fosforylację podjednostki regulatorowej MYPT1^{Thr696} i następcze zmniejszenie aktywności fosfatazy łańcuchów lekkich miozyny. Prowadzi to do fosforylacji łańcuchów lekkich miozyny i w efekcie do skurczu mięśni gładkich. Zastosowanie inhibitora ROCK – fasudilu przyczynia się do defosforylacji podjednostek MYPT1^{Thr696}, a tym samym zniesienia skurczu mięśni gładkich naczyń i ich rozszerzenia (Duong-Quy i wsp. 2013). W 2009 roku pojawiło się pierwsze doniesienie literaturowe wskazujące na zwiększoną aktywność szlaku RhoA/ ROCK u pacjentów z idiopatycznym PAH (Guilluy

i wsp. 2009). Wyniki kolejnych badań wykazały, że aktywność ta może być skorelowana ze stopniem zaawansowania choroby, w tym z podwyższonym ciśnieniem w tętnicy płucnej (Do e Z i wsp. 2009). Szereg badań eksperymentalnych potwierdziło korzyści blokady szlaku kinazy RhoA w kierunku ograniczenia dalszego rozwoju choroby. Dotyczyły one m.in. obniżenia ciśnienia w tętnicy płucnej, ciśnienia w prawej komorze serca (RVP, ang. right ventricle pressure), osłabienia remodelingu naczyń płucnych z ograniczeniem procesów proliferacji, a nasileniem apoptozy komórek mięśni gładkich naczyń krwionośnych (VSMC, ang. vascular smooth muscle cell) oraz zmniejszeniem przerostu prawej komory (RVH, ang. right ventricle hypertrophy). Korzyści inhibitorów ROCK w odniesieniu do ograniczenia remodelingu naczyń płucnych prawdopodobnie związane są z ich wpływem na zwiększenie ekspresji białka p27Kip. Białko to kontroluje cykl komórkowy poprzez regulację aktywności kompleksów CDK-cyklina, co skutkuje odwróceniem postępu cyklu komórkowego i ograniczeniem proliferacji VSMC (Duong-Quy i wsp. 2013). W dotychczasowych badaniach największą efektywnością odznaczały się: fasudil (HA- 1077) i jego aktywny metabolit – hydroksyfasudil. Obecnie fasudil, podobnie jak inne z tej grupy (Y-27632, KI-2309), nie posiada zarejestrowanego wskazania w terapii PAH. Jakkolwiek efekty stosowania fasudilu u pacjentów z PAH, jakie obserwowano w krótko- i średnioterminowych próbach klinicznych są obiecujące. Odnotowane korzyści terapii fasudilem podawanym dożylnie lub doustnie obejmują m.in. poprawę parametrów hemodynamicznych: obniżenie PAP i RVP oraz zwiększenie wskaźnika sercowego (Fukumoto i wsp. 2005; Fukumoto i wsp. 2013; Ishikura i wsp. 2006). Jakkolwiek zwraca się również uwagę na ryzyko obniżenia ciśnienia układowego (Gomberg-Maitland i wsp. 2013).

Inhibitory reduktazy HMG-CoA (HMGRI; statyny)

Ze szlakiem kinazy RhoA powiązane są także statyny – kompetycyjne inhibitory reduktazy 3-hydroksy-3-metyloglutarylo-koenzymu A (HMG-CoA), głównego enzymu w szlaku biosyntezy cholesterolu. Posiadają one dobrze udokumentowaną efektywność w obniżaniu stężenia cholesterolu lipoprotein o niskiej gęstości (LDL). Statyny okazały się też być lekami o działaniu wielokierunkowym (plejotropowym), wykraczającym poza ich podstawowy, efekt hipolipemizujący. Powyższym „plejotropizmom” statyn przypisuje się m.in. korzystny wpływ tej grupy leków na poprawę funkcji śródbłonna, indukcję apoptozy komórek naczyń krwionośnych, hamowanie proliferacji komórek mięśni gładkich, stabilizację blaszki miażdżycowej, tłumienie stresu oksydacyjnego i stanu zapalnego, a także hamowanie trombogenezy. Dzięki temu w ostatnich dwóch dekadach znaczenie inhibitorów reduktazy HMG-CoA w leczeniu chorób układu sercowo-naczyniowego znacznie wzrosło, a świadczy o tym m.in. ugruntowana pozycja statyn w prewencji pierwotnej i wtórnej zdarzeń sercowo-naczyniowych (Liao i wsp. 2005). Działanie plejotropowe statyn związane jest z zahamowaniem

przekształcenia kwasu β -hydroksy- β -metyloglutarylowego do kwasu mewalonowego, co skutkuje ograniczeniem syntezy izoprenoidów (np. pirofosforanu farnezylu, pirofosforanu geranylgeranylu). Związki te biorą udział w potranslacyjnej prenylacji białek, niezbędnej w procesie regulacji aktywności licznych białek wewnątrzkomórkowych, w tym niskocząsteczkowych GTP-az z rodziny białek G: Ras, Rac i Rho. Jak wykazano, statyny hamując izoprenylację białka Rho mogą wpływać negatywnie na przekąźnictwo RhoA/ROCK (Laufs i wsp. 1999). Jak wcześniej wspomniano, powyższemu szlakowi sygnałowemu przypisuje się istotną rolę w patogenezie tętniczego nadciśnienia płucnego, indukcji stresu oksydacyjnego oraz procesu zapalnego. Stąd w doniesieniach literaturowych pojawiły się hipotezy o potencjalnym, korzystnym wpływie tej grupy leków na odwrócenie zmian w tętniczym nadciśnieniu płucnym. Mają one łagodzić PAH poprzez hamowanie zależnej od białka RhoA kinazy Rho oraz poprzez działanie przeciwzapalne, przeciwutleniające i przeciwzakrzepowe (Katsiki i wsp. 2011). Obecnie statyny nie mają zarejestrowanego wskazania do postępowania terapeutycznego w PAH. Dotychczas przeprowadzone badania eksperymentalne, w tym na zwierzęcym modelu nadciśnienia płucnego indukowanego monokrotaliną, wykazały pewne korzyści statyn w PAH. Najlepiej „przebadaną” w tym kierunku jest lipofilna symwastatyna. Korzyści wynikające z jej zastosowania obejmowały m.in.: obniżenie parametrów hemodynamicznych (PAP, RVP), a także ograniczenie RVH, remodelingu naczyń płucnych i pogrubienia mięśniówki gładkiej poprzez zmniejszenie procesów proliferacji a nasilenie apoptozy SMC (Taraseviciene-Stewart i wsp. 2006). Dodatkowo obserwowano korzystny wpływ leku na zmniejszenie stresu oksydacyjnego poprzez zwiększenie aktywności śródbłonkowej syntazy tlenu azotu (eNOS) i redukcję syntezy wolnych rodników (Katsiki i wsp. 2011). Wyniki te nie znalazły pełnego potwierdzenia w próbach klinicznych. Dotychczas skuteczność i bezpieczeństwo terapii statynami pacjentów z PAH poddano ocenie w co najmniej trzech randomizowanych, kontrolowanych placebo badaniach klinicznych (badania: APATH, SiPHT, ASA-STAT). Odnotowane korzyści obejmowały wprowadzić redukcję przerostu prawej komory mięśnia sercowego i obniżenie poziomu markerów związanych z PAH (NTproBNP, P-selektyna), ale miały charakter przemijający. Wśród potencjalnych przyczyn wymienia się m.in. "nierównocенność" dotychczasowych badań w odniesieniu do kategorii PAH (np. pacjenci z PAH idiopatycznym, związanym z chorobami tkanki łącznej lub polekowym itd.), wielkości dawki, rodzaju zastosowanej statyny jak i ocenianych punktów końcowych. W konsekwencji wskazuje się na konieczność prowadzenia dalszych badań celem określenia potencjalnych korzyści statyn.

2.2.4. Model nadciśnienia płucnego indukowanego monokrotaliną

Na przestrzeni ostatnich lat badacze zajmujący się problematyką PH odnoszą się w większości swoich prac eksperymentalnych do dwóch modeli zapewniających rozwój tego schorzenia. Są one oparte na

wywołaniu przewlekłego niedotlenienia (CH, ang. chronic hypoxia) lub na indukcji nadciśnienia płucnego przez podanie monokrotaliny (ang. monocrotaline-induced pulmonary hypertension). W tym pierwszym przypadku, nadciśnienie płucne rozwija się w następstwie umieszczenia myszy lub szczurów w komorze normobarycznej lub hipobarycznej. W warunkach przewlekłego niedotlenienia dochodzi m.in. do przebudowy naczyń płucnych, znacznego wzrostu ciśnienia skurczowego w prawej komorze serca oraz jej przerostu. Powyższy model zwierzęcy nadciśnienia płucnego charakteryzuje się powtarzalnością i przewidywalnością wyników otrzymanych w badaniu na wybranym szczepie badanych zwierząt. Opisuje się jednak różnice międzygatunkowe w odpowiedzi na niedotlenienie. Obserwowana odpowiedź może być także uwarunkowana wiekiem zwierząt. Dodatkowo podkreśla się, że szereg zmian zarostowych, które pojawiają się u chorych z PH, nie rozwija się w tym modelu zwierzęcym. Wskazuje się, że zmiany w strukturze niedotlenionych płuc do jakich dochodzi w przebiegu choroby u ludzi mogą być wywołane nie tylko samym niedotlenieniem. Dlatego też wskazuje się na przydatność modelu CH w badaniach przedklinicznych odnoszących się do postaci nadciśnienia płucnego innych niż tętnicze nadciśnienie płucne. Dotyczy to np. postaci nadciśnienia płucnego rozwijających się w przebiegu chorób płuc i/lub hipoksji, takich jak: przewlekła obturacyjna choroba płuc, śródmiąższowa choroba płuc lub zaburzenia oddychania w czasie snu (Stenmark i wsp. 2006; Stenmark i wsp. 2009).

Monokrotalina (MCT) jest toksycznym alkaloidem pirolizydynowym otrzymywanym z roślin z gatunku *Crotalaria spectabilis*. Dokładny mechanizm indukcji nadciśnienia płucnego przez MCT nie jest znany. Wiadomo, że za toksyczne działanie alkaloidu odpowiada jego aktywny metabolit – dehydromonokrotalina, powstający w wyniku wątrobowej dehydratacji przy udziale cytochromu P-450. Jednorazowe, podskórne podanie związku powoduje uszkodzenie śródbłonna małych naczyń płucnych z nagromadzeniem jednojądrzastych komórek, w tym makrofagów, i rozwój zapalenia. Po upływie 7-14 dni dochodzi m.in. do przebudowy naczyń płucnych, ich skurczu i rozwoju nadciśnienia płucnego z przerostem prawej komory mięśnia sercowego (Meyrick i wsp. 1980). Model nadciśnienia płucnego indukowanego monokrotaliną jest obecnie często wykorzystywany w badaniach eksperymentalnych z uwagi na prostotę techniki, powtarzalność i podobieństwo patologicznych zmian (tzw. syndrom MCT) obserwowanych u zwierząt i ludzi. Związek ten indukuje jednak szereg zmian niespecyficznych dla „ludzkiej” postaci choroby. Wśród nich wymienia się: obrzęk pęcherzyków i naczyń płucnych, niedrożność żył płucnych, śródmiąższowe zwłóknienie płuc oraz obniżenie ciśnienia parcjalnego tlenu we krwi. Kardiotoksyczność MCT obejmuje działanie proarytmogenne; wysokie dawki monokrotaliny (60-300 mg/kg mc.) mogą prowadzić również do rozwoju hepatotoksyczności (Miyauchi i wsp. 1993). Wszystkie wyżej opisane efekty nie pozostają bez wpływu

na zwiększenie śmiertelności zwierząt, w porównaniu do innych modeli, w tym modelu nadciśnienia płucnego wywołanego niedotlenieniem. Tym niemniej, powyższy model wykorzystano do przedklinicznej oceny szeregu substancji stosowanych celem prewencji lub odwrócenia patologicznych zmian w PH, takich jak: prostanoidy, ETA, PDE-5i, statyny, TKI, inhibitory RAAS oraz RhoA (Stenmark i wsp. 2009).

Wśród innych zwierzęcych modeli tego schorzenia testowanych obecnie przez badaczy wymienia się m.in. te oparte na podaniu monokrotaliny z jednoczesną pneumonektomią lub na iniekcji SU-5416 – inhibitora VEGF w warunkach przewlekłej hipoksji. Opisuje się także modele związane modyfikacjami genetycznymi: wywołaniem nadekspresji genu S100A4/Mts1 i IL-6 lub delecji BMPR2 (Stenmark i wsp. 2009) (rycina 3).

2.2.5. Uwagi o metodyce badań

Badania prowadziłam w ramach pracy własnej (*Nowe opcje terapii nadciśnienia płucnego w badaniach hemodynamicznych, UM Łódź*).

Wszystkie procedury badawcze uzyskały akceptację Lokalnej Komisji Etycznej ds. Doświadczeń na Zwierzętach nr 9 w Łodzi (zgoda nr 48/ŁB565/2011; 17/ŁB602/2012; 67/ŁB636/2012; 68/ŁB637/2012; 58/ŁB679/2013; 84/ŁB695/2013). Badania były prowadzone na szczurach rasy Wistar outbred (samce). Dla realizacji postawionych celów badawczych, w tym oceny efektywności testowanych opcji terapeutycznych przeprowadzono pomiar następujących parametrów hemodynamicznych (znieczulenie ogólne): ciśnienie w prawej komorze mięśnia sercowego (RVP; mmHg); skurczowe ciśnienie tętnicze krwi (SABP; mmHg); średnie ciśnienie tętnicze krwi (MABP; mmHg); rozkurczowe ciśnienie tętnicze krwi (DABP; mmHg) i częstość akcji serca (HR; bpm) (Aparatura Hugo-Sachs Elektronik -HSE) oraz ocenę przerostu prawej komory mięśnia sercowego. Celem poszukiwań podłoża molekularnego przewidywanych interakcji lekowych w pobranym materiale biologicznym (osocze, homogenaty płuc) przeprowadzono dalsze analizy technikami immunoenzymatycznymi z wykorzystaniem czytnika ELISA.

Analizie statystycznej poddano wartości uzyskane z ciągłego pomiaru częstości akcji serca i ciśnienia tętniczego krwi (SABP, MABP, DABP), ciśnienia w prawej komorze mięśnia sercowego, wskaźnika jej przerostu (RV/LV+S) oraz wyniki analiz biochemicznych. Ocenę zmienności wyników pomiędzy badanymi grupami przeprowadzono przy użyciu jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) na poziomie istotności $\alpha = 0,05$. Liczebność zwierząt oszacowano na podstawie analizy mocy testu. Późniejsza analiza uzyskanych wyników wykazała moc testu na poziomie 80-90% przy $\alpha = 0,05$ dla kluczowego w niniejszych badaniach parametru czyli ciśnienia w prawej komorze mięśnia sercowego.

Ryc 3. Wybrane modele zwierzące nadciśnienia płucnego (wg. Stenmark i wsp. 2009)

Model	Arteriopatia naczyń płucnych przedwłośniczkowych	Pęcherzykowe niedotlenienie	Zapalenie naczyń/okołonacynowe	Powolny rozwój choroby (miesiące, lata); przewlekły przebieg	Porównywalna odpowiedź na leczenie ERA, PGI2, PDE-5i	Odpowiedź na tlenoterapię	Zmiany splotowate (<i>plexiform lesions</i>)	Sztuczność tętnic
Kliniczny model PAH	+	-	+	+	+	-	+	+
MCT	+	-	+	-	+	BD	-	BD
CH	+	+	+	-	+	+	-	+
MCT+pneumonektomia	+	-	+	-	+	BD	-	BD
Sugen 5416 +niedotlenienie	+	+	+	-	BD	-	-	BD
Nadekspresja S100A4	+	-	+	+	BD	BD	+	BD
Nadekspresja IL-6	+	+/-	+	+	BD	BD	+	BD

(MCT – monokrotalina, CH – przewlekłe niedotlenienie, BD- brak danych)

Jak przedstawiłam na schemacie (ryc. 2), włączone do cyklu prace eksperymentalne oparte są na modelu nadciśnienia płucnego u szczurów indukowanego monokrotaliną. Zastosowana dawka związku wynosiła 60 mg/kg mc. (jednorazowe wstrzyknięcie podskórne), a okres wywołania PH wynosił odpowiednio siedem (**P-3, P-4**) oraz czternaście dni (**P-5, P-6, P-7, P-8**). Po 7-dniowym lub 14-dniowym okresie wywołania, rozpoczynano 14-dniowe podawanie wybranych związków. Ich działanie oceniano w dalszych badaniach hemodynamicznych i biochemicznych odpowiednio w 22- lub 29 dniu doświadczenia. Cele badawcze dotyczyły oceny efektywności substancji/leków w odwróceniu patologicznych zmian do których dochodzi w przebiegu PH. Stąd stosowano model „terapeutyczny”, w którym, w odróżnieniu od modelu „prewencyjnego”, podawanie związków zawsze poprzedzało wywołanie nadciśnienia płucnego (**P-3 – P-8**). Jak wcześniej wspomniano, indukcja nadciśnienia płucnego za pomocą monokrotaliny powoduje sukcesywny przerost śródbłonna, proliferację mięśni gładkich i zmiany w grubości kompleksu błony środkowej tętnicy płucnej. Zmiany te inni badacze odnotowywali w badaniach histopatologicznych już 7-14 dni od indukcji PH (np. Sun i wsp. 2008; Klein i wsp. 2008). Taka analiza histopatologiczna stanowiłaby cenne uzupełnienie przeprowadzonych badań hemodynamicznych w odniesieniu do potwierdzenia odwrócenia PH przez leki/substancje poddane ocenie w badaniach opisanych w Autoreferacie.

Wybór opisywanego modelu zwierzęcego podyktowany był ponadto potwierdzonym przez innych badaczy wpływem MCT na upośledzenie przekazywania sygnałów uczestniczących w patomechanizmie PH, będących punktem uchwytu dla leków/substancji poddanych ocenie w opisanych niżej badaniach. Przykładowo, Khan i wsp. (2005) odnotowali w eksperymentalnym

modelu nadciśnienia płucnego indukowanego monokrotaliną zwiększoną aktywność kinazy Rho, a Schermuly i wsp. (2005) – nadekspresję i fosforylację mRNA genu dla receptora PDGF beta.

Dotychczas opisane badania eksperymentalne oparte na wyżej opisanym modelu różnią się zarówno wielkością zastosowanej dawki związku (40-105 mg/kg mc.), jak i okresem wywołania nadciśnienia, który mógł wynosić odpowiednio siedem (np. Sun i wsp. 2008), czternaście (np. Mouchaers i wsp. 2010; Satoh i wsp. 2009) lub dwadzieścia jeden dni (np. Liu i wsp. 2014; Elias-Al-Mamun i wsp. 2014). Różnice dotyczą także czasu podawania substancji/leków o potencjalnym działaniu prewencyjnym lub terapeutycznym. Wynosił on odpowiednio siedem, (np. Sun i wsp. 2008); czternaście, (np. Zhang i wsp. 2012); dwadzieścia jeden (np. Wang i wsp. 2011) lub dwadzieścia osiem dni (np. Zhang i wsp. 2011). Większość badań prowadzonych przed rozpoczęciem prac eksperymentalnych opisanych w (P-3÷P-8) odnosiło się do oceny działania prewencyjnego substancji/leków. W tym przypadku iniekcji monokrotaliną towarzyszyło rozpoczęcie, najczęściej przewlekłego, okresu podawania leków. Jak wyżej wspomniano zmiany wywołane przez MCT mogą mieć charakter letalny. Zwiększoną śmiertelność zwierząt inni badacze obserwowali już w 21 dniu po iniekcji MCT (Elias-Al-Mamun i wsp. 2014; Li i wsp. 2012) a zwiększenie RVP do wartości 80 mmHg po upływie dalszych 14 dni skutkowało przeżyciem zwierząt na poziomie 35% (Stenmark i wsp. 2009). Dlatego też w wyborze modelu zamykającego się w 22- lub 29 dniach doświadczenia kierowałam się ograniczeniem ryzyka zwiększonej śmiertelności zwierząt przy zapewnieniu rozwoju zmian typowych dla „syndromu MCT”.

2.2.6. Wyniki badań i dyskusja

I. Etap wstępny

Cel wstępnego etapu badań obejmował wybór potencjalnych skojarzeń lekowych do dalszej oceny eksperymentalnej w oparciu o dotychczas opisane na poziomie molekularnym wzajemne oddziaływania szlaków/przekaźników oraz substancji stosowanych dla odwrócenia patologicznych zmian powstających w przebiegu nadciśnienia płucnego.

P-1 Jasińska-Stroschein M, Orszulak-Michalak D.: The current approach into signaling pathways in pulmonary arterial hypertension and their implication in novel therapeutic strategies. *Pharmacol Rep.* 2014, 66, 552-64.

Procesy inicjujące powstawanie zmian patologicznych w tętniczym nadciśnieniu płucnym wciąż nie zostały dokładnie poznane, a etiologia choroby jest wieloczynnikowa i obejmuje liczne szlaki biochemiczne. Szlaki te mogą wzajemnie na siebie oddziaływać poprzez różne przekaźniki na drodze dodatnich/ujemnych sprzężeń zwrotnych, co skutkuje nasileniem/osłabieniem uwarunkowanego nimi efektu. Na złożoność zachodzących procesów będzie się składał także dodatkowy udział

substancji stosowanych dla odwrócenia patologicznych zmian powstających w przebiegu PAH. Z dotychczasowych doniesień wynika, że poprzez wpływ na aktywność przekaźników substancje te mogą nie tylko aktywować bądź hamować dany szlak biochemiczny ale także determinować wzajemnie swoją aktywność. Takie interakcje lekowe o charakterze farmakodynamicznym mogą odpowiadać za pojawienie się zarówno efektu addytywnego i synergistycznego, jak i antagonistycznego. Jak powszechnie wiadomo interakcje lekowe często w sposób istotny wpływają na profil farmakologiczny leków oraz decydują o efektywności i bezpieczeństwie leczenia. Aspekt ten poruszany jest chociażby przy okazji rozważania korzyści terapii skojarzonej PAH, jakkolwiek interakcje lekowe mogą dotyczyć nie tylko związków o zarejestrowanym ale i o potencjalnym wskazaniu w terapii PAH. Zagadnienia te omówiłam we włączonej do rozprawy habilitacyjnej pracy poglądowej (P-1).

Wynikiem przeprowadzonego studium literaturowego było usystematyzowanie aktualnej wiedzy na temat szlaków sygnałowych o istotnym znaczeniu w patomechanizmie PAH powiązanych z endoteliną, tlenkiem azotu, prostacykliną a także szlakami Rho/ROCK, PDGF, PPAR, RAAS oraz ich wzajemnych zależnościach. Przedstawiłam szereg hipotez tłumaczących mechanizmy takich powiązań. Dotyczyły one m.in. wpływu antagonistów receptora AT1 na hamowanie przekaźnictwa związanego z PDGF lub ROCK, osłabienia efektów związanych ze szlakiem PDGF przy jednoczesnej inhibicji ROCK, czy też wpływu PGI2 na zahamowanie aktywacji Rho. Opisano także powiązania szlaku tlenu azotu. Dotyczyły one przekaźnictwa Rho/ROCK – zwiększenie dostępności tlenu azotu w warunkach inhibicji szlaku oraz hamowanie Rho/ROCK przez tlenek azotu a także przekaźnictwa PDGF – wpływ syntazy tlenu azotu na zmniejszenie ekspresji PDGF. Poza samym mechanizmem potencjalnego działania substancji na ww. szlaki, w pracy przedstawiłam przykłady interakcji lekowych, które mogą wynikać z powyższych powiązań i odpowiadają za wzmocnienie lub osłabienie efektu farmakologicznego związków działających poprzez opisane ścieżki sygnałowe. Interakcje te obejmowały wpływ jednego z ligandów PPARy (rozyglitazon) na aktywność PDGF lub poziom ET-1, wpływ inhibitora AT1 (olmesartan) – na hamowanie efektów indukowanych przez PDGF, efekty skojarzenia inhibitora ROCK (fasudil), z PGI2 (beraprost) lub ERA (bozentan).

Wykazałam ponadto, że potencjalne korzyści opisanych na poziomie molekularnym interakcji skutkujących nasileniem/osłabieniem determinowanego przez nie efektu nie zawsze znajdują odzwierciedlenie w późniejszych badaniach eksperymentalnych lub klinicznych. Wymienione w publikacji zależności stały się punktem wyjścia do poszukiwania kolejnych, korzystnych interakcji lekowych opartych na opisanych w artykule szlakach, w szczególności związanych z przekaźnictwem PDGF i ROCK. Interakcje te, zgodnie z przedstawionymi celami badawczymi, miały obejmować

zarówno związki o udokumentowanym jak i potencjalnym zastosowaniu w PAH, tj., inhibitory kinazy Rho, kinazy tyrozynowej, fosfodiesterazy PDE-5 oraz reduktazy HMG-CoA (statyny) (ryc. 1).

P-2 Jasińska M, Owczarek J, Orszulak-Michalak D.: Statins: a new insight into their mechanisms of action and consequent pleiotropic effects. *Pharmacol Rep.* 2007, 59, 483-99.

Wśród leków o potencjalnym korzystnym wpływie na prewencję czy odwrócenie patologicznych zmian w PAH wymienia się inhibitory reduktazy HMG-CoA. Ich wielokierunkowe pleiotropowe działanie stało się punktem wyjścia do poszukiwań nowych wskazań do stosowania tej grupy leków wykraczających poza leczenie zaburzeń lipidowych czy też zapobieganie zdarzeniom sercowo-naczyniowym. Efekty działania farmakologicznego statyn od dawna znajdowały się wśród moich zainteresowań, czego dowodem są prace eksperymentalne i pogładowe opublikowane w latach 2005-2011. W jednej z prac (**P-2**) szczegółowo podjęłam temat „pleiotropizmów” statyn, a wiele opisywanych w pracy efektów może się wiązać, z obecnie dyskutowanym, korzystnym zastosowaniem leków tej grupy w PAH. Były to m.in.: wpływ na poprawę funkcji śródbłonna poprzez regulację aktywności syntazy tlenku azotu, hamowanie proliferacji VSMC oraz remodelingu naczyniowego, stabilizacja blaszki miażdżycowej, tłumienie stresu oksydacyjnego oraz działanie przeciwzakrzepowe. Opisane efekty powiązałam z hamowaniem przez statyny izoprenylacji małych białek G oraz z ich negatywnym wpływem na szlak sygnałowy RhoA/ROCK, któremu obecnie przypisuje się istotne znaczenie w patomechanizmie PAH. W pracy podjęłam także temat molekularnych mechanizmów działania przeciwzapalnego statyn. Obejmowały one wpływ HMGR na przekąźnictwo Rac, aktywację oksydazy NAD(P)H i produkcję wolnych rodników odgrywających niekorzystną rolę w rozwoju schorzenia. Wśród omawianych w (**P-2**) pleiotropizmów statyn znalazły się również efekty będące wynikiem powiązania leków tej grupy ze szlakiem sygnałowym AT1 (np. hamowanie wazokonstrykcji i przerostu mięśnia sercowego) oraz PPAR (np. ograniczenie procesów adhezji, migracji zapalenia w ścianie naczynia). Jak wiadomo, ww. szlakom przypisuje się obecnie potencjalne znaczenie w rozwoju PAH, a leki blokujące receptory AT1 czy będące ligandami dla receptorów aktywowanych przez proliferatory peroksysomów testowane są w badaniach przedklinicznych.

Konsekwencją powyższych zainteresowań badawczych były badania eksperymentalne podejmujące kwestię włączenia statyn do terapii tętniczego nadciśnienia płucnego (**P-3, P- 6 i P-7**).

II. Etap pierwszy

Cele I etapu badań obejmowały:

1. Ocenę efektów terapii skojarzonej opartej na leku celowanym – syldenafilu (PDE-5i) i wybranych inhibitorach szlaku RhoA/ROCK: rozuwastatynie oraz fasudil.
2. Ocenę przydatności wybranego modelu eksperymentalnego (model nadciśnienia płucnego u szczura z 7-dniowym okresem indukcji monokrotaliną) w weryfikacji postawionych hipotez badawczych.

P-3 Jasińska-Stroschein M, Owczarek J, Wesołowska A, Orszulak-Michalak D.: Rosuvastatin, sildenafil and their combination in monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rat. *Acta Pharm.* 2014, 64, 345-54.

Główne hipotezy badawcze:

- Przewlekła terapia inhibitorem reduktazy HMG-CoA wpływa na odwrócenie zmian patologicznych indukowanych przez podanie monokrotaliny w zwierzęcym modelu nadciśnienia płucnego.
- Wybrany model badawczy potwierdza korzyści inhibitora PDE-5 (syldenafilu) w terapii PH.
- Łączne przewlekłe stosowanie statyny z syldenafilem wywiera dalsze korzystne efekty a powyższa interakcja ma charakter addycji.

Przesłanką do przeprowadzenia badania były m.in. niejednoznaczne wyniki wcześniejszych prac eksperymentalnych podejmujących kwestię działania statyn w nadciśnieniu płucnym. Korzyści wynikające z włączenia tej grupy leków do konwencjonalnej (celowanej) terapii oceniano wcześniej w odniesieniu do statyn lipofilnych (m.in. symwastatyna), a wybrane modele badawcze dotyczyły głównie ich działania prewencyjnego. Przykładowo, Kuang i wsp. (2010) opierając się na takim modelu wykazali zwiększenie efektywności syldenafilu podawanego łącznie z symwastatyną. Odnotowano dalsze obniżenie ciśnienia w prawej komorze serca, ograniczenie przerostu RV oraz proliferacji PASMC wywołanych indukcją monokrotaliną. Podobnego efektu addycyjnego w prewencji zmian w PAH nie odnotowali jednak inni badacze włączający statynę do terapii syldenafilem (Lee i wsp. 2010) lub beraprostem – ERA (Satoh i wsp. 2009). Natomiast Zhao i wsp. (2009) wywołując PH przewlekłym niedotlenieniem (2 i 4 tyg.) w modelu terapeutycznym odnotowali jedynie częściowe korzyści terapii skojarzonej: symwastatyna+syildenafil. Nie były one poparte dalszym obniżeniem ciśnienia w tętnicy płucnej. Przeprowadzone badanie (**P-3**) było pierwszym z badań oceniających efekt terapeutyczny (nie prewencyjny) hydrofilnej rozuwastatyny w skojarzeniu z syldenafilem. Uzyskane przeze mnie wyniki potwierdziły, wykazany przez innych badaczy (Pei i wsp. 2011), „umiarkowany” wpływ samej rozuwastatyny na poprawę parametrów hemodynamicznych, ze szczególnym uwzględnieniem ciśnienia w prawej komorze serca oraz jej przerostu. Nie odnotowałam jednak dodatkowych korzyści w odwróceniu patologicznych zmian, jakie miałyby zapewnić takie postępowanie skojarzone. Nie obserwowałam także istotnych różnic w wartościach skurczowego,

średniego i rozkurczowego ciśnienia tętniczego krwi w odniesieniu do wszystkich badanych grup zwierząt.

W wybranym modelu doświadczalnym potwierdziłam również wpływ inhibitora reduktazy HMG-CoA stosowanego w monoterapii lub łącznie z PDE-5i na obniżenie osocznego poziomu peptydu natriuretycznego typu B (BNP). Uzyskane wyniki wskazują, że statyna może zmniejszać, zwiększone w przebiegu PH, napięcie ścian prawej komory. Podwyższony poziom BNP i NT-proBNP koreluje z gorszym rokowaniem (Heresi i wsp. 2011), ocenę tego ostatniego wykorzystuje się np. w badaniach kontrolnych i kwalifikujących do programu lekowego NFZ. Innym ocenianym w pracy parametrem biochemicznym był czynnik wzrostu śródbłonna naczyń typu A (VEGF-A, ang. vascular endothelial growth factor), odgrywający istotną rolę w procesach angiogenezy, wazodylatacji, czy migracji makrofagów. Przewlekłe, 14-dniowe podawanie statyny i syldenafilem spowodowało podwyższenie osocznego poziomu VEGF do wartości obserwowanych w grupie szczurów zdrowych, a istotnie wyższych od tych, wywołanych monokrotaliną. Rola VEGF w patomechanizmie rozwoju PAH nie jest do końca poznana, na co wskazują sprzeczne doniesienia o dodatniej lub ujemnej korelacji ekspresji VEGF z postępem schorzenia (Campbell i wsp. 2001; Le Cras i wsp. 2002; Tereseviciene i wsp. 2001). We wcześniejszych badaniach obserwowano obniżenie poziomu VEGF przez PDE-5i lub PGI₂ (Rondelet i wsp. 2004; Eddahibi i wsp. 2000). Inni badacze (Yigitaslan i wsp. 2012) wykorzystując model nadciśnienia płucnego indukowanego monokrotaliną odnotowali, porównywalny z obserwowanym przeze mnie, wzrost poziomu VEGF w następstwie 14- dniowego podawania leków (ERA, PDE-5i) przy istotnie niższym poziomie tego markera w osoczu i homogenatach tętnicy płucnej szczurów chorych. Wyjaśnieniem takiej niejednoznaczności może być hipoteza (Yigitaslan i wsp. 2012) o różnym wpływie VEGF na procesy apoptozy i remodelingu naczyniowego w zależności od zaawansowania choroby, której dopiero dalsze stadium miałoby być powiązane z VEGF i procesami proliferacji oraz angiogenezy.

Wnioski:

- Przewlekła terapia jedną ze statyn – hydrofilną rozuwastatyną (10 mg/kg mc.) wpłynęła nieznacznie, ale znamienne statystycznie na obniżenie podwyższonego ciśnienia w prawej komorze serca i ograniczenie jej przerostu wywołanych monokrotaliną.
- Wybrany model badawczy potwierdził korzyści inhibitora PDE-5 (syldenafilem, 25 mg/kg mc.) w terapii PH związane z hemodynamiką prawej komory i jej przerostem.
- łącznie przewlekłe stosowanie statyny z syldenafilem nie spowodowało dalszego odwrócenia badanych zmian wywołanych indukacją PH. Nie wpłynęło także na wartości ciśnienia układowego (ciśnienie tętnicze skurczowe, średnie, rozkurczowe).

- Korzyści zastosowania statyny i syldenafile w monoterapii lub w skojarzeniu dotyczyły obniżenia podwyższonego monokrotaliną poziomu BNP.
- 7-dniowy okres indukcji nadciśnienia płucnego był związany z obniżeniem poziomu VEGF. Może to wskazywać na niejednoznaczną rolę VEGF w patomechanizmie nadciśnienia płucnego, uwarunkowaną stopniem jego zaawansowania. Podawanie statyny i syldenafile w monoterapii lub w skojarzeniu wpłynęło na przywrócenie poziomu tego markera do wartości obserwowanych u szczurów zdrowych.

P-4 Jasińska-Stroschein M, Owczarek J, Łuczak A, Orszulak-Michalak D.: The Beneficial Impact of Fasudil and Sildenafil on Monocrotaline-Induced Pulmonary Hypertension in Rats: A Hemodynamic and Biochemical Study. *Pharmacology* 2013, 91, 178–84.

Główne hipotezy badawcze:

- Wybrany model badawczy potwierdza korzyści inhibitora ROCK (fasudil) związane z odwróceniem zmian patologicznych indukowanych przez podanie monokrotaliny w zwierzęcym modelu nadciśnienia płucnego.
- Łączne stosowanie syldenafile z fasudilem wywiera dalsze korzystne efekty w wybranym modelu a powyższa interakcja ma charakter addycji.

Publikacja **P-4**, podobnie jak **P-3**, jest wyrazem wstępnego poszukiwania optymalnych skojarzeń lekowych w badaniach eksperymentalnych. Przesłankę do wyboru skojarzenia lekowego: fasudil-sildenafil stanowiły doniesienia literaturowe o powiązaniu szlaku ROCK i NO/cGMP. Aktywacja tego ostatniego prowadzi do fosforylacji białka RhoA, uniemożliwiając translokację do błony komórkowej i aktywację efektora RhoA– kinazy ROCK. Tym samym sildenafil może pośrednio wpływać na aktywację szlaku ROCK (Guilluy i wsp. 2005). Wybrany model badawczy potwierdził, odnotowane w innych badaniach eksperymentalnych, korzyści stosowania inhibitora ROCK, stosowanego w wysokiej dawce 30 mg/kg mc. na poprawę hemodynamiki prawej komory i ograniczenie jej przerostu (Jiang i wsp. 2007). Praca **P-4** była jednocześnie pierwszą oceniającą efekty terapeutyczne łącznego przewlekłego podawania fasudilu w dawce 30 mg/kg m.c. oraz syldenafile. Nie odnotowałam istotnych różnic w wartościach skurczowego, średniego i rozkurczowego ciśnienia tętniczego krwi w odniesieniu do wszystkich badanych grup zwierząt. Natomiast u szczurów otrzymujących terapię skojarzoną wartości ciśnienia w prawej komorze serca oraz wskaźnika jej przerostu były istotnie niższe niż u nieleczonych ($p < 0,05$), ale porównywalne z wartościami tych parametrów u zwierząt otrzymujących sildenafil lub fasudil w monoterapii. Wspomniana terapia w każdym z tych przypadków spowodowała zmniejszenie wartości parametru do poziomu kontroli negatywnej (szczurów zdrowych). Brak spodziewanego efektu synergistycznego/addycyjnego testowanych związków mógł wynikać z niedostatecznego efektu 7-dniowej indukcji nadciśnienia płucnego. Wnioski z pracy potwierdziły późniejsze obserwacje innych badaczy (Elias-Al-Mamun i wsp.

2014). Autorzy na modelu z 21-dniowym okresem indukcji odnotowali addycyjny wpływ fasudilu i sylденаfilem na odwrócenie zmian w PH a terapia skojarzona nie zapewniła obniżenia omawianego parametru do wartości wyjściowych. Jak wcześniej wspomniano, stosowanie modelu opartego na 21- lub 28-dniowym okresie indukcji zwiększa istotnie ryzyko „utrąty” zwierząt w doświadczeniu; w cytowanej pracy (Al-Mamun i wsp. 2014) śmiertelność zwierząt w grupie MCT wynosiła 79%.

Przeprowadzone badanie **P-4** wykazało ponadto pozytywny wpływ inhibitora ROCK w monoterapii lub skojarzeniu na obniżenie BNP oraz podwyższenie VEGF. Otrzymane wyniki wskazują tym samym na korzyści z blokady szlaku ROCK zarówno przez fasudil (**P-4**) jak i statynę (**P-3**) odniesieniu do ww. parametrów; ich rolę w patomechanizmie PH omówiłam wcześniej. Innym ocenianym przeze mnie parametrem była frakcja HDL cholesterolu. Jej udział w rozwoju nadciśnienia płucnego nie jest do końca znany. Pojawiają się jednak doniesienia (Zhao i wsp. 2012; Heresi i wsp. 2010) o gorszym rokowaniu pacjentów z PAH i z obniżonym poziomem tej frakcji cholesterolu. Mogą to tłumaczyć właściwości przeciwzapalne, przeciwutleniające i przeciwzakrzepowe a także korzystny wpływ na śródbłonek i na wydłużenie okresu półtrwania prostacykliny przez frakcję HDL. W badaniu **P-4** wartości HDL nie różniły się znacząco ($p>0,05$) w przypadku zwierząt zdrowych oraz z zaindukowanym nadciśnieniem płucnym. Tym niemniej przewlekła terapia samym fasudilem lub łącznie z syldenafilem spowodowała istotne podwyższenie ww. parametru. W omawianej pracy po raz pierwszy podjęto ten aspekt działania fasudilu w PAH. Otrzymane wyniki są zbieżne z obserwacjami innych badaczy (Ma i wsp. 2011) prowadzonymi na modelu hipercholesterolemii i wskazują, że hamowanie szlaku ROCK przez fasudil wpływa korzystnie na gospodarkę lipidową.

Wnioski:

- Wybrany model badawczy potwierdził odnotowany w innych badaniach eksperymentalnych korzystny wpływ inhibitora ROCK, stosowanego w wysokiej dawce 30 mg/kg mc. na poprawę hemodynamiki prawej komory i ograniczenie jej przerostu, bez istotnego wpływu na wartości ciśnienia układowego.
- Łączne stosowanie fasudilu z syldenafilem (25 mg/kg mc.) nie spowodowało dalszego odwrócenia badanych zmian wywołanych indukcją PH.
- Brak spodziewanego efektu synergistycznego/addycyjnego testowanych związków mógł wynikać z niedostatecznego efektu indukcji nadciśnienia płucnego.
- Monokrotalina w zastosowanym modelu badawczym nie wpłynęła na zmiany poziomu cholesterolu frakcji HDL. Tym niemniej, przewlekła terapia fasudilem spowodowała podwyższenie poziomu tego parametru. Może to wskazywać na dodatkowy korzystny aspekt działania tego związku związany z poprawą rokowania pacjentów z obniżonym poziomem HDL w przebiegu PH.

III. Etap drugi

Wyniki uzyskane w etapie pierwszym (**P-4**) przyczyniły się do modyfikacji wybranego zwierzęcego modelu nadciśnienia płucnego poprzez wydłużenie okresu indukcji z 7 do 14 dni. Oczekiwano, że zapewni to dalszy rozwój patologicznych zmian i poprawi trafność weryfikacji postawionych hipotez badawczych. Zachowano 14-dniowy okres podawania związków, które podobnie jak w poprzednim etapie były testowane w odniesieniu do ich spodziewanego efektu terapeutycznego a nie tylko prewencyjnego.

Cele II etapu badań obejmowały:

- Ocenę efektów terapii skojarzonej obejmującej inhibitory szlaków: PDGF (imatynib) oraz ROCK (fasudil i rozuwastatyna).
- Potwierdzenie przydatności wydłużenia czasu indukcji nadciśnienia płucnego w ocenie efektywności wybranych skojarzeń lekowych.

P-5 Jasińska-Stroschein M, Owczarek J, Plichta P, Orszulak-Michalak D.: Concurrent Rho-Kinase and Tyrosine Kinase Platelet-Derived Growth Factor Inhibition in Experimental Pulmonary Hypertension. *Pharmacology* 2014, 93, 145-50.

Główne hipotezy badawcze:

- Przewlekła terapia inhibitorem ROCK w zredukowanej dawce (fasudil, 15 mg/kg mc.) wpływa na odwrócenie zmian patologicznych indukowanych przez podanie monokrotaliny w zwierzęcym modelu nadciśnienia płucnego.
- Wybrany model badawczy potwierdza obserwowane przez innych badaczy korzyści stosowania inhibitora PDGF (imatynib, 50 mg/kg mc.) związane z poprawą hemodynamiki i ograniczeniem przerostu prawej komory mięśnia sercowego.
- Łączne przewlekłe stosowanie fasudilu z imatynibem wywiera dalsze korzystne efekty w wybranym modelu a powyższa interakcja ma charakter addycji.
- Mechanizm spodziewanej interakcji lekowej dotyczy wpływu inhibitora ROCK na przekaźnictwo szlaku związanego z płytkopochodnym czynnikiem wzrostu.

Publikacja **P-5** stanowi kontynuację podjętych w **P-4** badań nad znaczeniem osłabienia przekaźnictwa RhoA/ROCK w terapii nadciśnienia płucnego. Przesłankę do realizacji kolejnego celu badawczego jakim była ocena efektywności skojarzenia inhibitorów szlaku związanego z kinazą Rho oraz PDGF stanowiło, dyskutowane już w **P-1**, osłabienie efektów wywołanych przez płytkopochodny czynnik wzrostu przy jednoczesnej inhibicji ROCK. Do oceny ww. efektu poza fasudilem, będącym już przedmiotem moich wcześniejszych badań, wybrałam imatynib – jeden z inhibitorów kinazy tyrozynowej. Lek ten, stosowany dotychczas w terapii białaczek szpikowych był jednocześnie

pierwszym z tej grupy terapeutycznej o popartych badaniami eksperymentalnymi i próbami klinicznymi korzyściach w PAH. Jak wskazują wcześniejsze badania *in vitro*, źródłem działania farmakologicznego leku w tej jednostce chorobowej (m.in. hamowanie procesów migracji i proliferacji PSMC) może być właśnie blokowanie szlaku PDGF poprzez inhibicję fosforylacji receptora PDGF. Opierając się na doniesieniu autorstwa Klein i wsp. (2008) dawkę leku ustaliłam na 50 mg/kg m.c. Przeprowadzone na takim samym modelu badanie **(P-5)** potwierdziło obserwowany w cytowanej pracy pozytywny wpływ związku na odwrócenie patologicznych zmian w PH.

Nowością była dokonana przeze mnie ocena efektów hemodynamicznych jednoczesnej blokady szlaków PDGF przez imatynib oraz ROCK przez fasudil. W jej wyniku odnotowałam zwiększenie efektywności obydwu związków, czego wyrazem było m.in. dalsze obniżenie ciśnienia w prawej komorze serca oraz jej przerostu. Stopień obniżenia RVP u zwierząt poddanych terapii skojarzonej przewyższał sumaryczny „udział” w obserwowanym efekcie obydwu związków, stąd zasugerowałam synergistyczny charakter powyższej interakcji. Poparciem hipotezy o, związanej z przewodnictwem PDGF, interakcji między omawianymi związkami wydają się być również odnotowane osoczowe poziomy PDGF. Były one znacząco niższe nie tylko w grupie samego imatynibu ale także u szczurów otrzymujących sam fasudil. Potwierdzałyby to opisany w badaniach *in vitro* (Liu i wsp. 2011) udział związku w hamowaniu szlaku PDGF, m.in. poprzez wpływ fasudilu na aktywację białka p27kip, uczestniczącego w regulacji cyklu komórkowego. Terapia skojarzona spowodowała dalsze obniżenie wartości PDGF w porównaniu do poziomu obserwowanego w przypadku monoterapii. Otrzymane wyniki potwierdzają jednocześnie hipotezę innych badaczy (Hatano i wsp. 2010) wyjaśniającą nieco zaskakujący fakt obniżenia a nie podwyższenia osoczowego poziomu PDGF w następstwie inhibicji szlaku. Obniżenie poziomu PDGF wskazuje na zahamowanie przez imatynib autokrynnej pętli. Jak wykazano wcześniej odpowiada ona za utrzymanie proliferacji i wzrostu komórek nowotworowych oraz za wysoki osoczowy poziom PDGF u pacjentów chorych onkologicznie (Yang i wsp. 2010). Nie można wykluczyć istnienia podobnego mechanizmu także w przypadku komórek mięśni gładkich tętnic płucnych w rozwoju nadciśnienia płucnego. Blokada receptorów dla PDGF przy słuszności takiej hipotezy oznaczałaby zahamowanie dalszej proliferacji PSMC i syntezy PDGF przez te komórki. W następstwie dochodziłoby do obniżenia przez imatynib poziomu PDGF w porównaniu do wartości wyjściowych; takie obniżenie odnotowano u pacjentów z tętniczym nadciśnieniem płucnym (Hatano i wsp. 2010) oraz w omawianej pracy **(P-5)**.

Przeprowadzone badanie eksperymentalne było pierwszym oceniającym korzyści jednoczesnego zastosowania inhibitorów TK i ROCK w terapii nadciśnienia płucnego. Należy jednak wspomnieć o wcześniejszym doniesieniu, którego autorzy (Burthem i wsp. 2007) poddali ocenie udział innego

inhibitora ROCK: Y-27632 oraz imatynibu w terapii przewlekłej białaczki szpikowej. W tym wypadku efekt jednoczesnego zastosowania leków związany był z nasileniem działania proapoptotycznego i antyproliferacyjnego na komórki nowotworowe ale także przewyższał skuteczność monoterapii. W odróżnieniu od etapu pierwszego (P-4), w omawianej pracy (P-5) zastosowano dawkę fasudilu zmniejszoną o połowę, tj. z 30 do 15 mg/kg mc. Wyniki potwierdziły umiarkowany wpływ monoterapii inhibitorem ROCK w niższej dawce na obniżenie RVP i RVH, czemu towarzyszyło zmniejszenie aktywności ROCK w homogenatach płuc. Jednocześnie wskazują one na kolejną potencjalną korzyść dyskutowanej interakcji z inhibitorem PDGF. Jest nią możliwość redukcji dawki fasudilu (lub/i imatynibu), a tym samym – ryzyka działań niepożądanych leku przy zachowaniu efektywności terapeutycznej.

Wnioski:

- Przewlekła terapia inhibitorem ROCK w zredukowanej dawce (fasudil, 15 mg/kg mc.) spowodowała obniżenie ciśnienia w prawej komorze i zmniejszenie wskaźnika jej przerostu wywołane monokrotaliną, czemu towarzyszyło zmniejszenie aktywności ROCK w homogenatach płuc.
- Potwierdzono, obserwowane przez innych badaczy, korzyści stosowania inhibitora PDGF (imatynib, 50 mg/kg mc.) celem odwrócenia ww. zmian.
- Łączne przewlekłe stosowanie fasudilu z imatynibem spowodowało dalsze obniżenie omawianych parametrów. Otrzymane wyniki wskazują na synergizm powyższej interakcji w odniesieniu do poprawy parametrów RVP i RVH.
- Mechanizm obserwowanej interakcji lekowej może być związany z wpływem inhibitora ROCK na hamowanie przekazywania sygnału PDGF. Zmiany w poziomie PDGF, jakie obserwowano po podaniu imatynibu i fasudilu w monoterapii lub skojarzeniu, potwierdzają hipotezę innych badaczy o udziale autokrynnej pętli w regulacji efektów mediowanych PDGF.
- Łączne stosowanie inhibitora ROCK z imatynibem przy obniżeniu RVP nie wpłynęło istotnie na obniżenie ciśnienia układowego.
- Wydłużenie czasu indukcji nadciśnienia płucnego spowodowało dalszy wzrost ciśnienia w prawej komorze serca bez wpływu na zwiększenie śmiertelności badanych zwierząt.

W świetle otrzymanych wyników postawiłam kolejne pytanie badawcze – czy podobne ograniczenie efektów związanych ze szlakiem PDGF może być następstwem inhibicji ROCK przez inny czynnik, jakim jest inhibitor reduktazy HMG-CoA (HMGRI). Uzyskałam pozytywne wstępne wyniki wskazujące na istotne zwiększenie efektywności imatynibu stosowanego łącznie ze statyną przy umiarkowanym wpływie samej statyny na „odwrócenie” zmian w PH. W rezultacie kontynuowałam badania w dwóch kierunkach. Po pierwsze, podjęłam dalsze poszukiwania korzystnych skojarzeń lekowych z udziałem

statyny jako czynnika wzmacniającego efekt blokady szlaku ROCK (**P-6**). Po drugie, kontynuowałam badania z udziałem imatynibu i statyn (**etap trzeci**).

P-6 Jasińska-Stroschein M, Owczarek J, Sołtysiak U, Orszulak-Michalak D.: Rosuvastatin intensifies the beneficial effects of Rho-kinase inhibitor in reversal of monocrotaline-induced pulmonary hypertension *Arch Med Sci*. DOI: 10.5114/aoms.2015.49740.

Główne hipotezy badawcze:

- łączne przewlekłe stosowanie inhibitora ROCK w zredukowanej dawce (fasudil, 15 mg/kg mc.) z rozuwastatyną wywiera dalsze korzystne efekty na wybranym modelu zwierzęcym.
- Mechanizm spodziewanej interakcji lekowej dotyczy wpływu statyny na przekąźnictwo związane ze szlakiem ROCK.

Praca (**P-6**) jest efektem pierwszego kierunku poszukiwań. Stanowi ona jednocześnie kontynuację moich zainteresowań badawczych statynami (**P-2, P-3**). Główny wniosek sformułowany w pracy dotyczy korzyści wynikających z nasilenia działania fasudilu w niższej dawce (15 mg/kg) przez statynę. W wyniku łącznego przewlekłego podawania fasudilu i rozuwastatyny szczurom z 14-dniową indukcją PH monokrotaliną odnotowano m.in. dalsze (w porównaniu do samego fasudilu) obniżenie RVP i ograniczenie przerostu RV. Otrzymane wyniki wskazują, że za interakcję statyna-fasudil może odpowiadać dalsza inhibicja przekąźnictwa Rho/ROCK przez statynę. Świadczy o tym zmniejszona aktywność ROCK w homogenatach płuc szczurów poddanych terapii skojarzonej w porównaniu do samego fasudilu. W obrębie poszukiwań odpowiedzi na pytanie o mechanizm intensyfikacji działania inhibitora ROCK znalazł się również szlak związany z tlenkiem azotu. Jak wiadomo, patologiczne zmiany zachodzące w mięśniówce gładkiej i śródbłonku tętnic płucnych mogą być związane z upośledzeniem śródbłonkowego wydzielania NO. Z kolei inhibitory reduktazy HMG-CoA w następstwie hamowania izoprenylacji małych białek G mogą przywracać prawidłowy poziom tlenu azotu poprzez zwiększenie ekspresji eNOS. Celem potwierdzenia potencjalnej roli ww. mechanizmu w odwróceniu zmian wywołanych indukcją PH, dokonałam pomiaru poziomu śródbłonkowej syntazy tlenu azotu (eNOS) w homogenatach płuc pozyskanych od poszczególnych grup zwierząt biorących udział w eksperymencie. Otrzymane wyniki potwierdziły postawioną hipotezę. Poziom eNOS w grupie: fasudil+statyna był znamienne wyższy w porównaniu do grupy kontroli pozytywnej. Co więcej, niższe (w porównaniu do terapii skojarzonej) poziomy eNOS w grupie samego fasudilu wskazywały na decydujący udział statyny, a nie fasudilu, w przywróceniu szlaku NO. Otrzymane przeze mnie wyniki są także potwierdzeniem wcześniejszych badań (Naraoka i wsp. 2013) przeprowadzonych na modelu indukowanego krwawienia podpajęczynówkowego u królików. Wspomniani autorzy wykazali na zwierzęcym modelu, innego niż PAH, schorzenia korzyści łącznego

przewlekłego podawania statyny – pitawastatyny oraz fasudilu. Były one związane z prewencją skurczu naczyń mózgowych po wywołanym krwawieniem. Podobnie, mechanizm odpowiadający za nasilenie działania fasudilu obejmował indukowane przez statynę: dalsze zmniejszenie aktywności ROCK oraz zwiększenie aktywności eNOS w tętnicach mózgowych (Naraoka i wsp. 2013).

Omówione wyniki badań **(P-6)** wskazują na pozytywną rolę statyn w terapii fasudilem. Potencjalne korzyści kliniczne mogą dotyczyć także możliwości stosowania fasudilu w niższych dawkach w warunkach jednoczesnej terapii statyną. Lek jest na ogół dobrze tolerowany i dotychczas nie odnotowano poważnych działań niepożądanych. Wskazuje się jednak na, opisywane we wcześniejszych badaniach eksperymentalnych (Jiang i wsp. 2007), ryzyko obniżenia ciśnienia układowego. Takie potencjalne działanie, odnotowane również w omawianym badaniu **(P-6)**, przypisuje się większości leków stosowanych w ramach farmakoterapii celowanej PAH. Należy jednak zwrócić uwagę na fakt dalszego obniżenia skurczowego ciśnienia tętniczego krwi jakie odnotowano w grupie fasudil+statyna. Potwierdzenia istotności klinicznej takiej interakcji należałoby szukać w dalszych badaniach z udziałem pacjentów z PAH.

Wnioski:

- Przewlekłe podawanie fasudilu (15 mg/kg mc.) z rozuwastatyną (10 mg/kg mc.) spowodowało dalsze obniżenie parametrów RVP i RVH w wybranym modelu badawczym.
- Mechanizm obserwowanej interakcji lekowej może być związany z wpływem statyny na wzmocnienie efektu blokady szlaku ROCK. Wskazywała na to obniżona aktywność ROCK w homogenatach płuc zwierząt poddanych terapii skojarzonej w porównaniu do samego fasudilu.
- Dodatkowe korzyści związane ze stosowaniem statyny dotyczyły przywrócenia szlaku tlenu azotu, na co wskazywała zwiększona aktywność śródbłonkowej syntazy tlenu azotu w grupie zwierząt otrzymujących statynę z fasudilem ale nie sam fasudil.
- Łączne przewlekłe stosowanie inhibitorów ROCK: statyna + fasudil może powodować dalsze obniżenie ciśnienia układowego.

IV. Etap trzeci

W kolejnym etapie kontynuowałam badania eksperymentalne z wykorzystaniem modelu nadciśnienia płucnego indukowanego monokrotaliną. Zachowałam 29-dniowy schemat doświadczenia, obejmujący z 14-dniową indukcję PH oraz 14-dniowe podawanie testowanych związków. Podobnie jak w poprzednich etapach skupiłam się na spodziewanym efekcie terapeutycznym a nie prewencyjnym.

Głównym celem była odpowiedź na pytanie o efektywne i bezpieczne skojarzenia lekowe z udziałem inhibitora szlaku PDGF – imatynibu.

P-7 Jasińska-Stroschein M, Owczarek J, Surowiecka A, Kącikowska J, Orszulak-Michalak D.: HMG-CoA reductase inhibitors: an opportunity for the improvement of imatinib safety. An experimental study in rat pulmonary hypertension. *Pharmacol Rep.* 2015, 67, 32-7.

Główne hipotezy badawcze:

- Łączne stosowanie inhibitora PDGF (imatynib, 50 mg/kg mc.) ze statyną wywiera dalsze korzystne efekty w wybranym modelu a powyższa interakcja ma charakter addycji.
- Dzięki spodziewanej interakcji dodanie statyny pozwala na zachowanie terapeutycznej efektywności imatynibu przy redukcji jego dawki.

Wyniki przedstawione w publikacji **P-7** stanowią kontynuację poszukiwań odpowiedzi na pytanie, czy przesłanki wskazujące na ograniczenie efektów związanych ze szlakiem PDGF przez jednoczesną inhibicję ROCK (badania *in vitro*) znajdują odzwierciedlenie w odwróceniu niekorzystnych zmian w PH, takich jak: poprawa hemodynamiki i ograniczenie przerostu prawej komory. W świetle wcześniejszych wyników wskazujących na synergizm/addycję połączenia lekowego: imatynib-fasudil (**P-5**) postanowiłam ocenić efektywność skojarzenia TKI z innym inhibitorem szlaku ROCK – statyną. Do wstępnych badań eksperymentalnych, podobnie jak w **P-3** i **P-6**, wybrano rozuwastatynę. Ta hydrofilna statyna, wprowadzona do leczenia w Polsce w 2009 roku, posiada właściwości hipolipemizujące i przeciwzapalne przewyższające pozostałe leki z tej grupy. Otrzymane wyniki wykazały umiarkowany wpływ samej statyny na odwrócenie PAH przy jednoczesnym nasileniu działania imatynibu podawanego przewlekle w dawce 50 mg/kg mc. W rezultacie zredukowano dawkę imatynibu do 20 mg/kg m.c. oraz rozszerzono badania o lipofilną symwastatynę. Tym samym postanowiłam zbadać czy rozpatrywana interakcja pozwoli na utrzymanie efektywności terapeutycznej imatynibu w warunkach znacznej redukcji jego dawki. Powyższy cel był podyktowany ostatnimi doniesieniami o niezadowalającym profilu bezpieczeństwa leku (Hoeper i wsp. 2013) i wskazywaną koniecznością kontynuowania badań nad zastosowaniem imatynibu w PAH. Drugim celem badawczym było oszacowanie czy wpływ statyny na efektywność inhibitora TK może być uwarunkowany jej stopniem lipofilności lub udziałem cytochromu P-450 w metabolizmie leku. Wyniki zaprezentowane w **P-7** były pierwszymi, jakie dotyczyły oceny skojarzenia inhibitorów reduktazy HMG-CoA i kinazy tyrozynowej w badaniach *in vivo*. Łączne podawanie jednej ze statyn oraz imatynibu w niskiej dawce (20 mg/kg mc.) pozwoliło na utrzymanie efektu związanego z obniżeniem RVP oraz ograniczeniem przerostu prawej komory co najmniej na poziomie obserwowanym dla samego imatynibu w wyższej dawce (50 mg/kg mc.). Natomiast monoterapia

imatynibem w dawce 20 mg/kg m.c. przy niewielkim ale istotnym obniżeniu RVP nie miała wpływu na ograniczenie RVH. Podobnie wcześniejsze badania eksperymentalne przeprowadzone na modelu PH indukowanego MCT lub hipoksją nie wykazały znaczącego działania leku w dawkach 1 i 10 mg/kg mc. (podanie dootrzewnowe) (Schermyly i wsp. 2005) lub 5 mg/kg mc. (podanie dożylnie) (Abe i wsp. 2011). Tym samym, potencjalne korzyści kliniczne wynikające z **P-7** mogłyby dotyczyć możliwości stosowania imatynibu w niższych dawkach w warunkach jednoczesnej terapii statyną, przy zachowaniu efektywności leku i poprawie jego profilu bezpieczeństwa. Jak już wspomniano, wyniki badań klinicznych zwracają uwagę na nierozwiązaną kwestię stosunku korzyści do ryzyka leku w terapii PAH, czy też na potrzebę ustalenia minimalnej efektywnej dawki imatynibu. W dotychczasowych próbach klinicznych wynosiła ona 400 mg/dobę i była dawką jaką stosuje się w terapii onkologicznej.

Przeprowadzone badanie było również pierwszym porównującym działanie dwóch statyn w aspekcie rozpatrywanej interakcji. Otrzymane wyniki wskazują na istotną ($p < 0,05$) przewagę monoterapii lipofilną symwastatyną nad hydrofilną rozuwastatyną, w odwróceniu podwyższonego RVP. W konsekwencji, wartości tego parametru były znamienne niższe w przypadku skojarzenia tej statyny z imatynibem. Niewiele jest badań porównujących bezpośrednio efekty statyn w PAH („head to head trias”). Otrzymane wyniki są jednak zbieżne z wcześniejszymi badaniami na eksperymentalnym modelu przewencyjnym PH. Takie działanie przewencyjne wykazywały lipofilne: atorwastatyna i symwastatyna ale nie hydrofilna prawastatyna (Satoh i wsp. 2009). Powyższe obserwacje może tłumaczyć fakt gorszej dystrybucji hydrofilnej statyny do kompartmentu tkankowego.

Przy potencjalnych korzyściach omawianej interakcji lekowej należy jednak zwrócić uwagę na dalsze obniżenie skurczowego ciśnienia tętniczego krwi, jakie odnotowałam w grupach zwierząt poddanych terapii skojarzonej (różne statyny, różne dawki imatynibu). Potwierdzenia istotności klinicznej ww. efektu hipotensji układowej, obserwowanej również we wcześniejszych badaniach (**P-6**), należałoby szukać w dalszych badaniach z udziałem pacjentów z PAH.

Wnioski:

- Podobnie jak w modelu z 7-dniowym okresem indukcji (**etap pierwszy**) wykazano umiarkowany wpływ samej statyny na odwrócenie PAH.
- Przewlekłe podawanie wybranych statyn z imatynibem (50 mg/kg mc.) spowodowało dalsze obniżenie parametrów RVP i RVH w wybranym modelu badawczym a obserwowana interakcja miała charakter addycji.

- łączne podawanie statyny oraz imatynibu w niskiej dawce (20 mg/kg mc.) pozwoliło na utrzymanie efektu związanego z obniżeniem RVP oraz ograniczeniem RVH. Wskazuje to na potencjalne kliniczne korzyści z zachowania działania leku, związanego z hamowaniem PDGF, i z poprawy jego profilu bezpieczeństwa w warunkach jednoczesnej terapii statyną.
- Terapia oparta na skojarzeniu statyny z imatynibem może wpływać na obniżenie ciśnienia układowego.

P-8 Jasińska-Stroschein M, Owczarek J, Cicha K, Orszulak-Michalak D.: The influence of imatinib at a low dose and sildenafil on pulmonary hypertension in rats. *Pharmazie* DOI: 10.1691/ph.2015.4891

Główna hipoteza badawcza:

Łączne stosowanie inhibitora PDGF w zredukowanej dawce (imatynib, 20 mg/kg mc.) z inhibitorem PDE-5 (syldenafil) wywiera dalsze korzystne efekty w wybranym modelu a powyższa interakcja ma charakter addycji.

W świetle uzyskanych wyników wskazujących na potencjalne korzyści kliniczne w aspekcie poprawy profilu bezpieczeństwa, jakie może przynieść włączenie statyn do terapii imatynibem postawiłam kolejne pytanie badawcze (**P-8**). Dotyczyło ono efektywności terapii skojarzonej: imatynib-syldenafil. Przesłankę stanowiły doniesienia innych badaczy (Li i wsp. 2007) o możliwym powiązaniu szlaków NO/cGMP i PDGF. Powiązanie to obejmowało aktywację przez PDE-5i szlaku NO/cGMP, następującą indukcję fosfatazy kinaz MAP (MPK-1, ang. mitogen-activated protein kinase phosphatase-1), prowadzącą do dezaktywacji kinaz ERK1/2 (Lin i wsp. 2003). Z kolei kaskada kinazy ERK stanowi jeden ze szlaków różnicowania komórek i podlega aktywacji przez PDGF. Może to oznaczać hamujący wpływ sildenafilu na procesy indukowane przez PDGF. Ponadto, sildenafil łączy z imatynibem wspólny metabolizm wątrobowy przy udziale cytochromu P-450. Dotychczas nie poddano ocenie takiego skojarzenia leków i tym samym hipotetycznego ryzyka kompetycyjnego metabolizmu tych dwóch związków skutkującego ryzykiem nasilenia działania i/lub pogorszeniem bezpieczeństwa stosowania imatynibu i/lub sildenafilu. W badaniu zastosowałam niższą z dawek imatynibu, tj. 20 mg/kg mc. Głównym jego wynikiem jest wykazanie istotnego ($p < 0,05$) obniżenia parametrów związanych z PH (RVP, RVH) w warunkach łącznego stosowania imatynibu z sildenafilem w porównaniu zarówno do samego sildenafilu jak i imatynibu, przy jednoczesnym obniżeniu ciśnienia układowego. Odnotowane wyniki wskazują na korzystną interakcję o charakterze addycji między ww. lekami, prowadzącą do nasilenia działania imatynibu. We wspomnianym wcześniej badaniu klinicznym IMPRES najlepsze wyniki poprawy wydolności wysiłkowej obserwowano w grupie pacjentów otrzymujących imatynib w skojarzeniu z PDE-5i i ERA (Hooper i wsp. 2013). Tym niemniej, nie znaleziono w dostępnej literaturze wyników innych badań klinicznych odnoszących bezpośrednio korzyści terapii: imatynib plus sildenafil w porównaniu do samego sildenafilu.

Wnioski:

- Podobnie jak w modelu z 7-dniowym okresem indukcji (**etap pierwszy**) potwierdzono korzystny wpływ syldenafilu (25 mg/kg mc.) na odwrócenie zmian wywołanych indukcją monokrotaliną.
- Odnotowano korzystną interakcję o charakterze addycji między syldenafilem a imatynibem, co może wskazywać na możliwe powiązanie szlaków NO/cGMP i PDGF.
- Otrzymane wyniki mogą sugerować korzyści kliniczne takiego postępowania skojarzonego przy możliwości redukcji dawek imatynibu i ograniczenia ryzyka pojawienia się działań niepożądanych.

2.2.7. Podsumowanie osiągnięć stanowiących podstawę habilitacji

Podsumowując, eksperymentalny model nadciśnienia płucnego indukowanego monokrotaliną zapewnił rozwinięcie pewnych patologicznych zmian charakterystycznych dla tego schorzenia, m.in. wzrost ciśnienia i przerost prawej komory mięśnia sercowego ale bez istotnego wpływu na wartości ciśnienia układowego. Obserwowana zmiana wartości kluczowych w ocenie parametrów (tj. RVP i RVH; szczury zdrowe vs szczury z zaindukowanym PH) była przy tym porównywalna do tej uzyskanych przez innych badaczy prowadzących badania z wykorzystaniem tego samego modelu. Potwierdził się również wykazany przez innych badaczy wpływ MCT na upośledzenie przekaźnictwa szlaków sygnałowych. Świadczyły o tym zmiany aktywności kinazy Rho, poziomów PDGF, NO czy BNP i VEGF odnotowanych w osoczu lub homogenatach płuc szczurów zaindukowanych monokrotaliną, co pozwoliło na dalszą weryfikację hipotez o ich powiązaniu z testowanymi w pracy związkami.

Tym niemniej wybrany w pierwszym etapie, wykorzystany także przez innych badaczy model, opierający się na 7-dniowym okresie indukcji okazał się niewystarczający do weryfikacji efektów proponowanych skojarzeń lekowych. Brak spodziewanego efektu synergistycznego/addycyjnego testowanych związków (syldenafil – statyna, syldenafil – fasudil) mógł wynikać z niedostatecznego efektu indukcji nadciśnienia płucnego. Dlatego też, celem zwiększenia trafności weryfikacji sformułowanych hipotez dokonałam modyfikacji modelu poprzez wydłużenie okresu indukcji z 7 do 14 dni. Zapewniło to dalsze pogorszenie hemodynamiki prawej komory serca (np. wzrost RVP średnio o 40%) bez wpływu na zwiększenie śmiertelności zwierząt, będącej efektem stosowania modeli dłuższych, tj. z 21- lub 28-dniowym czasem indukcji. Model ten potwierdził również wcześniejsze wyniki otrzymane na modelu z 7-dniowym okresem indukcji dotyczące terapii statyną lub syldenafilem.

Badania przeprowadzone na wybranym modelu zwierzęcym potwierdziły hipotezę o hamowaniu efektów mediowanych przez PDGF w wyniku inhibicji kinazy Rho, czego dowodem był addycyjny/synergistyczny charakter interakcji obejmującej inhibitory ROCK (fasudil lub statyny) i PDGF (imatynib). Uzyskane wyniki wskazujące na zwiększenie efektywności imatynibu przez statynę

przy umiarkowanym wpływie samej statyny na odwrócenie zmian w PH pozwoliły na kontynuację badania nad rolą statyn w PAH w dwóch kierunkach. Po pierwsze wykazałam wpływ HMGR1 na zachowanie efektów związanych ze stosowaniem TKI (obniżenie RVP oraz ograniczenie przerostu prawej komory serca) także w warunkach znacznej redukcji jego dawki. Pozostaje to nie bez znaczenia w świetle nierozwiązanej kwestii profilu bezpieczeństwa imatynibu w terapii PAH. Po drugie, podjęłam dalsze poszukiwania korzystnych skojarzeń lekowych z udziałem statyny jako czynnika wzmacniającego efekt blokady szlaku ROCK. W rezultacie wykazałam, że przewlekłe podawanie fasudilu z rozuwastatyną skutkuje dalszym obniżeniem parametrów RVP i RVH a mechanizm obserwowanej interakcji lekowej może być związany z wpływem statyny na wzmocnienie efektu blokady szlaku ROCK a także przywrócenia szlaku związanego z tlenkiem azotu.

Odnosząc się do sformułowanych we **Wstępie** głównych celów badawczych, główne wnioski z przeprowadzonych badań są następujące:

- Model nadciśnienia płucnego indukowanego monokrotalinem oparty na 14-dniowej indukcji i 14-dniowym okresie podawania leków pozwolił na oszacowanie wpływu testowanych związków na zmiany wybranych parametrów hemodynamicznych oraz biochemicznych przy niezmienionej przeżywalności zwierząt. Wybrany model badawczy potwierdził odnotowane przez innych badaczy korzyści stosowania inhibitora PDE-5 (syldenafil, 25 mg/kg mc.), inhibitora ROCK (fasudil, 15 mg/kg mc.), inhibitora TK (imatynib, 50 mg/kg mc.), statyny (symwastatyna, rozuwastatyna, 10 mg/kg mc.) w terapii PH w odniesieniu do hemodynamiki prawej komory i jej przerostu (**etap II, III**).
- łączne przewlekłe stosowanie sildenafilu z fasudilem (30 mg/kg mc.) lub statyną nie spowodowało dalszego odwrócenia badanych zmian wywołanych indukcją PH. Korzyści zastosowania statyny i sildenafilu w monoterapii lub skojarzeniu dotyczyły obniżenia, podwyższonego przez MCT, poziomu BNP na modelu zwierzęcym z 7-dniowym czasem indukcji (**etap I**). Wykazano także korzystny wpływ inhibitora ROCK na podwyższenie poziomu HDL.
- Terapia skojarzona: fasudil z imatynibem wpłynęła na dalszą redukcję omawianych parametrów. Interakcja lekowa miała charakter synergizmu w odniesieniu do poprawy hemodynamiki a jej mechanizm może być związany z wpływem inhibitora ROCK na hamowanie przekazywania sygnału PDGF. Zmiany w poziomie PDGF potwierdzają hipotezę innych badaczy o udziale autokrynnej pętli w regulacji efektów mediowanych PDGF (**etap II**).
- Terapia skojarzona: fasudil w niższej dawce (15 mg/kg mc.) z rozuwastatyną spowodowała dalsze obniżenie parametrów RVP i RVH w wybranym modelu badawczym. Mechanizm tej interakcji był związany z wpływem statyny na wzmocnienie efektu blokady szlaku ROCK oraz ze zwiększeniem aktywności szlaku NO. Takie skojarzenie lekowe może jednak wpływać na obniżenie ciśnienia układowego (**etap II**).

- Terapia skojarzona: imatynib w niskiej dawce (20 mg/kg mc.) plus statyny lub syldenafil pozwoliła na utrzymanie wpływu TKI na obniżenie RVP oraz na ograniczenie przerostu prawej komory serca. Wskazuje to na potencjalne korzyści kliniczne związane z zachowaniem efektywności leku, opartej na hamowaniu PDGF i z poprawą jego profilu bezpieczeństwa w warunkach jednoczesnej terapii statyną lub sildenafilem. Takie skojarzenie lekowe może jednak wpływać na obniżenie ciśnienia układowego (**etap III**).

2.2.8. Piśmiennictwo

Abe K, Toba M, Alzoubi A, Koubsky K, Ito M, Ota H, Gairhe S, Gerthoffer WT, Fagan KA, McMurtry IF, Oka M. Tyrosine kinase inhibitors are potent acute pulmonary vasodilators in rats. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2011, 45, 804-8.

Arnold WP, Mittal CK, Katsuki S, Murad F. Nitric oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3':5'-cyclic monophosphate levels in various tissue preparations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977, 74, 3203-7.

Burtham J, Rees-Unwin K, Mottram R, Adams J, Lucas GS, Spooner E, Whetton AD. The rho-kinase inhibitors Y-27632 and fasudil act synergistically with imatinib to inhibit the expansion of ex vivo CD34(+) CML progenitor cells. *Leukemia* 2007, 21, 1708-14.

Callebert J, Esteve JM, Hervé P, Peoc'h K, Tournois C, Drouet L, Launay JM, Maroteaux L. Evidence for a control of plasma serotonin levels by 5-hydroxytryptamine(2B) receptors in mice. *J Pharmacol Exp Ther*. 2006, 317, 724-31.

Cheitlin MD, Hutter AM Jr, Brindis RG, Ganz P, Kaul S, Russell RO Jr, Zusman RM. Use of sildenafil (Viagra) in patients with cardiovascular disease. Technology and Practice Executive Committee. *Circulation*. 1999, 99, 168-77.

Do e Z, Fukumoto Y, Takaki A, Tawara S, Ohashi J, Nakano M, Tada T, Saji K, Sugimura K, Fujita H, Hoshikawa Y, Nawata J, Kondo T, Shimokawa H. Evidence for Rho-kinase activation in patients with pulmonary arterial hypertension. *Circ J*. 2009, 73, 1731-9.

Duong-Quy S, Bei Y, Liu Z, Dinh-Xuan AT. Role of Rho-kinase and its inhibitors in pulmonary hypertension. *Pharmacol Ther*. 2013, 137, 352-64.

Eddahibi S, Humbert M, Sediame S, Chouaid C, Partovian C, Maître B, Teiger E, Rideau D, Simonneau G, Sitbon O, Adnot S. Imbalance between platelet vascular endothelial growth factor and platelet-derived growth factor in pulmonary hypertension. Effect of prostacyclin therapy. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000, 162, 1493-9.

Elias-Al-Mamun M, Satoh K, Tanaka S, Shimizu T, Nergui S, Miyata S, Fukumoto Y, Shimokawa H. Combination therapy with fasudil and sildenafil ameliorates monocrotaline-induced pulmonary hypertension and survival in rats. *Circ J*. 2014, 78, 967-76.

Fedorowicz A, Chłopicki S. Farmakologia śródbłonna w nadciśnieniu płucnym. *Kardiol Pol*. 2005, 63, S462-71.

Francis SH, Busch JL, Corbin JD, Sibley D. cGMP-dependent protein kinases and cGMP phosphodiesterases in nitric oxide and cGMP action. *Pharmacol Rev*. 2010, 62, 525-63.

Fukumoto Y, Matoba T, Ito A, Tanaka H, Kishi T, Hayashidani S, Abe K, Takeshita A, Shimokawa H. Acute vasodilator effects of a Rho-kinase inhibitor, fasudil, in patients with severe pulmonary hypertension. *Heart* 2005, 91, 391-2.

Fukumoto Y, Yamada N, Matsubara H, Mizoguchi M, Uchino K, Yao A, Kihara Y, Kawano M, Watanabe H, Takeda Y, Adachi T, Osanai S, Tanabe N, Inoue T, Kubo A, Ota Y, Fukuda K, Nakano T, Shimokawa H. Double-blind, placebo-controlled clinical trial with a rho-kinase inhibitor in pulmonary arterial hypertension. *Circ J*. 2013, 77, 2619-25.

Galiè N, Corris PA, Frost A, Girgis RE, Granton J, Jing ZC, Klepetko W, McGoon MD, McLaughlin VV, Preston IR, Rubin LJ, Sandoval J, Seeger W, Keogh A. Updated treatment algorithm of pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol*. 2013, 24, D60-D72.

Galiè N, Ghofrani HA, Torbicki A, Barst RJ, Rubin LJ, Badesch D, Fleming T, Parpia T, Burgess G, Branzi A, Grimminger F, Kurzyna M, Simonneau G; Sildenafil Use in Pulmonary Arterial Hypertension (SUPER) Study Group. Sildenafil citrate therapy for pulmonary arterial hypertension. *N Engl J Med*. 2005, 353, 2148-57.

Galiè N, Hoeper MM, Humbert M, Torbicki A, Vachiery JL, Barbera JA, Beghetti M, Corris P, Gaine S, Gibbs JS, Gomez-Sanchez MA, Jondeau G, Klepetko W, Opitz C, Peacock A, Rubin L, Zellweger M, Simonneau G. Task Force for Diagnosis and Treatment of Pulmonary Hypertension of European Society of Cardiology (ESC); European Respiratory Society (ERS); International Society of Heart and Lung Transplantation (ISHLT), Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension. *Eur Respir J*. 2009, 34, 1219-63.

Galiè N, Manes A, Branzi A. The endothelin system in pulmonary arterial hypertension. *Cardiovasc Res*. 2004, 61, 227-37.

Ghofrani HA, Morrell NW, Hoeper MM, Olschewski H, Peacock AJ, Barst RJ, Shapiro S, Golpon H, Toshner M, Grimminger F, Pascoe S. Imatinib in pulmonary arterial hypertension patients with inadequate response to established therapy. *Am J Respir Crit Care Med*. 2010, 182, 1171-7.

Gomberg-Maitland M, Bull TM, Saggar R, Barst RJ, Elgazayerly A, Fleming TR, Grimminger F, Rainisio M, Stewart DJ, Stockbridge N, Ventura C, Ghofrani AH, Rubin LJ. New trial designs and potential therapies for pulmonary artery hypertension. *J Am Coll Cardiol*. 2013, 62, (25 Suppl), D82-91.

Guilluy C, Eddahibi S, Agard C, Guignabert C, Izikki M, Tu L, Savale L, Humbert M, Fadel E, Adnot S, Loirand G, Pacaud P. RhoA and Rho kinase activation in human pulmonary hypertension: role of 5-HT signaling. *Am J Respir Crit Care Med*. 2009, 179, 1151-8.

Guilluy C, Sauzeau V, Rolli-Derkinderen M, Guérin P, Sagan C, Pacaud P, Loirand G. Inhibition of RhoA/Rho kinase pathway is involved in the beneficial effect of sildenafil on pulmonary hypertension. *Br J Pharmacol*. 2005, 146, 1010-8.

Hatano M, Yao A, Shiga T, Kinugawa K, Hirata Y, Nagai R. Imatinib mesylate has the potential to exert its efficacy by down-regulating the plasma concentration of platelet-derived growth factor in patients with pulmonary arterial hypertension. *Int Heart J*. 2010, 51, 272-6.

Heldin CH, Westermark B. Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor. *Physiol Rev*. 1999, 79, 1283-316.

Heresi GA, Aytakin M, Newman J, DiDonato J, Dweik RA. Plasma levels of high-density lipoprotein cholesterol and outcomes in pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med*. 2010, 182, 661-8.

Heresi GA. Clinical perspective: biomarkers in pulmonary arterial hypertension. *Int J Clin Pract Suppl*. 2011, 169, 5-7.

Hoeper M, Leuchte H, Halank M, Wilkens H, Meyer FJ, Seyfarth HJ, Wensel R, Ripken F, Bremer H, Kluge S, Hoeffken G, Behr J. Combining inhaled iloprost with bosentan in patients with idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir J*. 2006, 4, 691-4.

Hoeper MM, Barst RJ, Bourge RC, Feldman J, Frost AE, Galiè N, Gómez-Sánchez MA, Grimminger F, Grünig E, Hassoun PM, Morrell NW, Peacock AJ, Satoh T, Simonneau G, Tapson VF, Torres F, Lawrence D, Quinn DA, Ghofrani HA. Imatinib mesylate as add-on therapy for pulmonary arterial hypertension: results of the randomized IMPRES study. *Circulation* 2013, 127, 1128-38.

Humbert M, Barst RJ, Robbins IM, Channick RN, Galiè N, Boonstra A, Rubin LJ, Horn EM, Manes A, Simonneau G. Combination of bosentan with epoprostenol in pulmonary arterial hypertension: BREATHE-2. *Eur Respir J* 2004, 24, 353-9.

Humbert M, Morrell NW, Archer SL, Stenmark KR, MacLean MR, Lang IM, Christman BW, Weir EK, Eickelberg O, Voelkel NF, Rabinovitch M. Cellular and molecular pathobiology of pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol*. 2004, 43, 13S–4.

Ishikura K, Yamada N, Ito M, Ota S, Nakamura M, Isaka N, Nakano T. Beneficial acute effects of rho-kinase inhibitor in patients with pulmonary arterial hypertension. *Circ J*. 2006, 70, 174-8.

Jiang BH, Tawara S, Abe K, Takaki A, Fukumoto Y, Shimokawa H. Acute vasodilator effect of fasudil, a Rho-kinase inhibitor, in monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2007, 49, 85-9.

Katsiki N, Wierzbicki AS, Mikhailidis DP. Pulmonary arterial hypertension and statins: an update. *Curr Opin Cardiol*. 2011, 26, 322-6.

Kawut SM, Bagiella E, Lederer DJ, Shimbo D, Horn EM, Roberts KE, Hill NS, Barr RG, Rosenzweig EB, Post W, Tracy RP, Palevsky HI, Hassoun PM, Girgis RE; ASA-STAT Study Group. Randomized clinical trial of aspirin and simvastatin for pulmonary arterial hypertension: ASA-STAT. *Circulation* 2011, 123, 2985-93.

Khan I, Oriowo MA, Chandrasekhar B, Kadavil EA. Attenuated noradrenaline-induced contraction of pulmonary arteries from rats treated with monocrotaline: role of rho kinase. *J Vasc Res*. 2005, 42, 433-40.

Klein M, Schermuly RT, Ellinghaus P, Milting H, Riedl B, Nikolova S, Pullamsetti SS, Weissmann N, Dony E, Savai R, Ghofrani HA, Grimminger F, Busch AE, Schäfer S. Combined tyrosine and serine/threonine kinase inhibition by sorafenib prevents progression of experimental pulmonary hypertension and myocardial remodeling. *Circulation* 2008, 118, 2081-90.

Kloza M, Baranowska-Kuczek M, Pędzińska-Betiuk A, Jackowski K, Kozłowska H. [Serotonin hypothesis and pulmonary artery hypertension]. *Postepy Hig Med Dosw. (Online)*. 2014, 68, 738-48.

Kopeć G, Podolec P. Clinical significance of measuring inflammatory markers in patients with pulmonary arterial hypertension. *Pol Arch Med Wewn*. 2015, 125, 215-6.

Kuang T, Wang J, Pang B, Huang X, Burg ED, Yuan JX, Wang C. Combination of sildenafil and simvastatin ameliorates monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. *Pulm Pharmacol Ther*. 2010, 23, 456-64.

Laufs U, Marra D, Node K, Liao JK. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase inhibitors attenuate vascular smooth muscle proliferation by preventing rho GTPase-induced down-regulation of p27(Kip1). *J Biol Chem*. 1999, 274, 21926-31.

Lee DS, Kim YK, Jung YW. Simvastatin, sildenafil and their combination in monocrotaline induced pulmonary arterial hypertension. *Korean Circ J*. 2010, 40, 659-64.

Li B, Yang L, Shen J, Wang C, Jiang Z. The antiproliferative effect of sildenafil on pulmonary artery smooth muscle cells is mediated via upregulation of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 and degradation of extracellular signal-regulated kinase 1/2 phosphorylation. *Anesth Analg*. 2007, 105, 1034-41.

Li XL, Guan RJ, Li JJ. Attenuation of monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension in rats by rosuvastatin. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2012, 60, 219-26.

Liao JK, Laufs U. Pleiotropic effects of statins. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2005, 45, 89-118.

Lin YW, Chuang SM, Yang JL. ERK1/2 achieves sustained activation by stimulating MAPK phosphatase-1 degradation via the ubiquitin-proteasome pathway. *J Biol Chem*. 2003, 278, 21534-41.

Liu AJ, Ling F, Wang D, Wang Q, Lü XD, Liu YL. Fasudil inhibits platelet-derived growth factor-induced human pulmonary artery smooth muscle cell proliferation by up-regulation of p27kip¹ via the ERK signal pathway. *Chin Med J (Engl)*. 2011, 124, 3098-104.

Liu M, Wang Y, Zheng L, Zheng W, Dong K, Chen S, Zhang B, Li Z. Fasudil reversed MCT-induced and chronic hypoxia-induced pulmonary hypertension by attenuating oxidative stress and inhibiting the expression of Trx1 and HIF-1 α . *Respir Physiol Neurobiol*. 2014, 201, 38-46.

McLaughlin VV, McGoon MD. Pulmonary arterial hypertension. *Circulation* 2006, 114, 1417-31.

McLaughlin VV, Oudiz RJ, Frost A, Tapson VF, Murali S, Channick RN, Badesch DB, Barst RJ, Hsu HH, Rubin LJ. Randomized study of adding inhaled iloprost to existing bosentan in pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 2006, 174, 1257-63.

Meyrick B, Gamble W, Reid L. Development of Crotalaria pulmonary hypertension: hemodynamic and structural study. *Am J Physiol*. 1980, 239, H692-702.

Miyauchi T, Yorikane R, Sakai S, Sakurai T, Okada M, Nishikibe M, Yano M, Yamaguchi I, Sugishita Y, Goto K. Contribution of endogenous endothelin-1 to the progression of cardiopulmonary alterations in rats with monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *Circ Res*. 1993, 73, 887-97.

Moreno-Vinasco L, Garcia JG. Receptor tyrosine kinase inhibitors in rodent pulmonary hypertension. *Adv Exp Med Biol*. 2010, 661, 419-34.

Morrell NW, Adnot S, Archer SL, Dupuis J, Jones PL, MacLean MR, McMurtry IF, Stenmark KR, Thistlethwaite PA, Weissmann N, Yuan J X.-J, E. Weir EK. Cellular and molecular basis of pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol*. 2009, 54, S20-S31.

Mouchaers KT, Schaliij I, de Boer MA, Postmus PE, van Hinsbergh VW, van Nieuw Amerongen GP, Vonk Noordegraaf A, van der Laarse WJ. Fasudil reduces monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension: comparison with bosentan and sildenafil. *Eur Respir J*. 2010, 36, 800-7.

Mubarak KK. A review of prostaglandin analogs in the management of patients with pulmonary arterial hypertension. *Respir Med*. 2010, 104, 9-21.

Naraoka M, Munakata A, Matsuda N, Shimamura N, Ohkuma H. Suppression of the Rho/Rho-Kinase Pathway and Prevention of Cerebral Vasospasm by Combination Treatment with Statin and Fasudil After Subarachnoid Hemorrhage in Rabbit. *Transl Stroke Res*. 2013, 4, 368-74.

Olschewski H, Rose F, Schermuly R, Ghofrani HA, Enke B, Olschewski A, Seeger W. Prostacyclin and its analogues in the treatment of pulmonary hypertension. *Pharmacol Ther*. 2004, 102, 139-53.

Opitz CF, Ewert R, Kirch W, Pittrow D. Inhibition of endothelin receptors in the treatment of pulmonary arterial hypertension: does selectivity matter? *Eur Heart J*. 2008, 29, 1936-48.

Patterson KC, Weissmann A, Ahmadi T, Farber HW. Imatinib mesylate in the treatment of refractory idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Ann Intern Med*. 2006, 145, 152-3.

Pei Y, Ma P, Wang X, Zhang W, Zhang X, Zheng P, Yan L, Xu Q, Dai G. Rosuvastatin attenuates monocrotaline-induced pulmonary hypertension via regulation of Akt/eNOS signaling and asymmetric dimethylarginine metabolism. *Eur J Pharmacol*. 2011, 666, 165-72.

Perros F, Montani D, Dorfmüller P, Durand-Gasselin I, Tcherakian C, Le Pavec J, Mazmanian M, Fadel E, Mussot S, Mercier O, Hervé P, Emilie D, Eddahibi S, Simonneau G, Souza R, Humbert M. Platelet-derived growth factor expression and function in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med*. 2008, 178, 81-8.

Pietra GG, Capron F, Stewart S, Leone O, Humbert M, Robbins IM, Reid LM, Tudor RM. Pathologic assessment of vasculopathies in pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol*. 2004, 43, 25S-32S.

Pulido T, Adzerikho I, Channick RN, Delcroix M, Galiè N, Ghofrani HA, Jansa P, Jing ZC, Le Brun FO, Mehta S, Mittelholzer CM, Perchenet L, Sastry BK, Sitbon O, Souza R, Torbicki A, Zeng X, Rubin LJ, Simonneau G;

SERAPHIN Investigators. Macitentan and morbidity and mortality in pulmonary arterial hypertension. *N Engl J Med*. 2013, 369, 809-18.

Rondelet B, Kerbaul F, Van Beneden R, Motte S, Fesler P, Hubloue I, Rimmelink M, Brimiouille S, Salmon I, Ketelslegers JM, Naeije R. Signaling molecules in overcirculation-induced pulmonary hypertension in piglets: effects of sildenafil therapy. *Circulation* 2004, 110, 2220-5.

Satoh M, Satoh A. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl (HMG)-CoA reductase inhibitors and phosphodiesterase type V inhibitors attenuate right ventricular pressure and remodeling in a rat model of pulmonary hypertension. *J Pharm Pharm Sci*. 2009, 11, 118s-30s.

Schermuly RT, Dony E, Ghofrani HA, Pullamsetti S, Savai R, Roth M, Sydykov A, Lai YJ, Weissmann N, Seeger W, Grimminger F. Reversal of experimental pulmonary hypertension by PDGF inhibition. *J Clin Invest*. 2005, 115, 2811-21.

Simonneau G, Gatzoulis MA, Adatia I, Celermajer D, Denton C, Ghofrani A, Gomez Sanchez MA, Krishna Kumar R, Landzberg M, Machado RF, Olshchewski H, Robbins IM, Souza R. Updated clinical classification of pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol*. 2013, 62, D34–D41.

Simonneau G, Rubin L, Galiè N, Barst RJ, Fleming T, Frost A, Engel PJ, Kramer MR, Burgess G, Collings L, Cossons N, Sitbon O, Badesch BD, for the Pulmonary Arterial Hypertension combination Study of Epoprostenol and Sildenafil (PACES) Study Group. Addition of sildenafil to long-term intravenous epoprostenol therapy in patients with pulmonary arterial hypertension. *Ann Intern Med* 2008, 149, 521–30.

Stenmark KR, Fagan KA, Frid MG. Hypoxia-induced pulmonary vascular remodeling: cellular and molecular mechanisms. *Circ Res*. 2006, 99, 675-91.

Stenmark KR, Meyrick B, Galiè N, Mooi WJ, McMurtry IF. Animal models of pulmonary arterial hypertension: the hope for etiological discovery and pharmacological cure. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2009, 297, L1013-32.

Sun X, Ku DD. Rosuvastatin provides pleiotropic protection against pulmonary hypertension, right ventricular hypertrophy, and coronary endothelial dysfunction in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2008, 294, H801-9.

Taraseviciene-Stewart L, R. Scerbavicius, K. H. Choe, C. Cool, K. Wood, R. M. Tuder, N. Burns, M. Kasper and N. F. Voelkel, Simvastatin causes endothelial cell apoptosis and attenuates severe pulmonary hypertension. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2006, 291, L668-76.

Wang W, Wang YL, Chen XY, Li YT, Hao W, Jin YP, Han B. Dexamethasone attenuates development of monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension. *Mol Biol Rep*. 2011, 38, 3277-84.

Waxman AB, Zamanian RT. Pulmonary arterial hypertension: new insights into the optimal role of current and emerging prostacyclin therapies. *Am J Cardiol*. 2013, 111, 1A-16A.

Wharton J, Strange JW, Møller GM, Growcott EJ, Ren X, Franklyn AP, Phillips SC, Wilkins MR. Antiproliferative effects of phosphodiesterase type 5 inhibition in human pulmonary artery cells. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005, 172, 105-13.

Wilkins MR, Ali O, Bradlow W, Wharton J, Taegtmeyer A, Rhodes CJ et al.; Simvastatin Pulmonary Hypertension Trial (SiPHT) Study Group. Simvastatin as a treatment for pulmonary hypertension trial. *Am J Respir Crit Care Med*. 2010, 181, 1106-13.

Yang J, Liu X, Nyland SB, Zhang R, Ryland LK, Broeg K, Baab KT, Jarbaban NR, Irby R, Loughran TP. Platelet-derived growth factor mediates survival of leukemic large granular lymphocytes via an autocrine regulatory pathway. *Blood* 2010, 115, 51–60.

Yigitaslan S, Sirmagul B. Relation of bosentan, iloprost, and sildenafil with growth factor levels in monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *Clin Exp Hypertens*. 2012, 34, 222-9.

Zeng WJ, Xiong CM, Zhao L, Shan GL, Liu ZH, Xue F, Gu Q, Ni XH, Zhao ZH, Cheng XS, Wilkins MR, He JG; Atorvastatin in Pulmonary Arterial Hypertension (APATH) Study Group. Atorvastatin in pulmonary arterial hypertension (APATH) study. *Eur Respir J.* 2012, 40, 67-74.

Zhang WH, Liu CP, Zhang YJ, Ji YQ, Lu WX, Zeng Q. Additive effect of tadalafil and simvastatin on monocrotaline-induced pulmonary hypertension rats. *Scand Cardiovasc J.* 2012, 46, 374-80.

Zhang WH, Zhang YJ, Liu CP, Yu BX, Lu WX. Simvastatin protects against the development of monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats via a heme oxygenase-1-dependent pathway. *Exp Lung Res.* 2011, 37, 492-9.

Zhao L, Sebkhii A, Ali O, Wojciak-Stothard B, Mamanova L, Yang Q et al. Simvastatin and sildenafil combine to attenuate pulmonary hypertension. *Eur Respir J.* 2009, 34, 948-57.

Zhao QH, Peng FH, Wei H, He J, Chen FD, Di RM, Jiang X, Jiang R, Chen YJ, Heresi GA, Jing ZC. Serum high-density lipoprotein cholesterol levels as a prognostic indicator in patients with idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Am J Cardiol.* 2012, 110, 433-9.

3. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

W 2001 roku ukończyłam z wynikiem bardzo dobrym studia na Wydziale Farmaceutycznym Akademii Medycznej w Łodzi. W tym samym roku podjęłam studia doktoranckie w Zakładzie Biofarmacji, Wydziału Farmaceutycznego AM w Łodzi, gdzie od 2003 roku pracowałam naukowo na stanowisku asystenta. W 2006 roku uzyskałam stopień doktora nauk farmaceutycznych. Tematem mojej rozprawy doktorskiej był „Wpływ simwastatyny i wybranych antagonistów kanałów wapniowych na mięsień sercowy królików” (Promotor: Prof. dr hab. Daria Orszulak-Michalak). Od 2008 roku jestem zatrudniona w Zakładzie Biofarmacji Uniwersytetu Medycznego w Łodzi na stanowisku adiunkta.

Przed uzyskaniem stopnia doktora nauk farmaceutycznych wyniki mojej pracy naukowej były opublikowane w 4 publikacjach oryginalnych i 4 publikacjach przeglądowych (IF=2,251; MNiSW: 41) a także przedstawione na 5 konferencjach naukowych.

Po uzyskaniu stopnia doktora nauk farmaceutycznych mój dorobek naukowy obejmuje 21 prac oryginalnych oraz 17 publikacji przeglądowych (IF=22,219; MNiSW: 432). Ponadto wyniki mojej pracy były prezentowane na 14 konferencjach naukowych, w tym 3 zagranicznych, zarówno w formie doniesień ustnych jak i posterowych.

Sumaryczny *impact factor* moich wszystkich publikacji wynosi 24,47 (473 punktów MNiSW) a liczba cytowań wg bazy Web of Science: 233 (285 wg Scopus).

Byłam recenzentem publikacji naukowych w czasopismach: *Current Pharmaceutical Design* (IF₂₀₁₃=3,288); *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* (IF₂₀₁₃=2,089); *Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System* (IF₂₀₁₃=2,271); *Saudi Journal of Biological Sciences* (IF₂₀₁₃=0,741); *Croatian Medical Journal* (IF₂₀₁₃= 1,373); *Journal of Pulmonary and Respiratory Medicine*.

Mój dorobek naukowy obejmuje publikacje eksperymentalne, w przeważającej części z zakresu farmakologii doświadczalnej. Poza modelem nadciśnienia płucnego, wykorzystanym w badaniach opisanych w Autoreferacie, publikacje te prezentują wyniki badań prowadzonych na takich doświadczalnych modelach zwierzęcych jak: króliki z miopatią indukowaną statynami, szczury normotensyjne, szczury z normo- i hipercholesterolemią, czy też model świnki morskiej do oceny działania uczulającego. Wymienione modele doświadczalne wykorzystywałam w pracy naukowej zarówno przed jak i po uzyskaniu stopnia doktora a moje poszukiwania badawcze od początku skupiały się m.in. na różnych aspektach stosowania inhibitorów reduktazy HMG-CoA. Powyższe zainteresowania obejmowały kwestie bezpieczeństwa farmakoterapii, ze szczególnym uwzględnieniem niekorzystnego wpływu statyn na mięśnie poprzecznie prążkowane. Wyrazem tych zainteresowań były także badania poświęcone plejotropizmom statyn i wynikającym z nich interakcjom z innymi lekami działającymi na układ sercowo-naczyniowy. Konsekwencją ww. poszukiwań stanowi także część prac objętych rozprawą i dotyczących roli statyn w terapii nadciśnienia płucnego.

Jedną z pierwszych prac (*Pharmacol Rep.* 2005, 57, 1), której byłam współautorem (udział 85%) dotyczyła patomechanizmów miopatii mięśni szkieletowych, ze szczególnym uwzględnieniem roli inhibitorów reduktazy HMG-CoA. W pracy przedstawiłam szereg hipotez tłumaczących podłoże molekularne udziału statyn w rozwoju miopatii, odnosząc je także do mechanizmów działania substancji z innych grup terapeutycznych. Praca ta cieszyła się zainteresowaniem wśród innych badaczy (96 cytowań). Inna praca (*Pharmacol Rep.* 2011, 63, 4), także poruszająca aspekt bezpieczeństwa stosowania statyn została wyróżniona naukową nagrodą Rektora w 2012 roku.

W latach 2003-2005, prowadziłam badania eksperymentalne nad udziałem jednej ze statyn (simwastatyny), podawanej w skojarzeniu z wybranymi antagonistami kanałów wapniowych, w rozwoju spodziewanego uszkodzenia mięśnia sercowego. Oceniałam takie parametry hemodynamiczne jak: wskaźnik minutowy serca (ze szczególnym uwzględnieniem wydolności mięśnia sercowego w odpowiedzi na wlew dopaminy), częstość akcji serca, ciśnienie tętnicze krwi, wskaźnik całkowitego obwodowego oporu naczyniowego oraz biochemiczne markery uszkodzenia mięśni poprzecznie prążkowanych: szkieletowych i sercowego. Wykazałam m.in., że skojarzone podawanie symwastatyny, w dawkach wywołujących miopatię mięśni szkieletowych, z nifedypiną może wpływać niekorzystnie na mięsień sercowy, na co wskazywały parametry hemodynamiczne; zwiększenie stężenia jednej z troponin oraz zmiany w obrazie histopatologicznym mięśnia sercowego. W zaproponowanym układzie badawczym (królik z indukowaną miopatią mięśni szkieletowych, bez indukowanej hipercholesterolemii i nadciśnienia) symwastatyna powodowała także obniżenie

skurczowego ciśnienia tętniczego i nasilała aktywność hipotensyjną antagonisty kanału wapniowego. Badania te prowadziłam w ramach projektów badawczych: *Ocena histopatologiczna i elektrokardiograficzna serca po łącznym podaniu dużych dawek simwastatyny z wybranymi inhibitorami cytochromu CYP3A4; Wpływ łącznego podawania wybranych inhibitorów kanałów wapniowych i simwastatyny na parametry hemodynamiczne u królików* (UM Łódź) we współpracy z ówczesnym Zakładem Mikroskopii Elektronowej Akademii Medycznej w Łodzi. Uzyskane wyniki weszły w skład rozprawy doktorskiej i zostały przedstawione w 3 publikacjach oryginalnych oraz na 2 konferencjach naukowych w formie doniesienia ustnego i posteru.

Wyrazem moich zainteresowań badawczych lekami z grupy statyn jest także część prac eksperymentalnych i poglądowych opublikowanych po uzyskaniu stopnia doktora. Eksperymenty prowadzone w latach 2007- 2012 stanowiły kontynuację badań nad interakcjami statyn z innymi lekami działającymi na układ sercowo-naczyniowy. Dotyczyły one m.in. wpływu statyn na parametry hemodynamiczne w warunkach jednoczesnego stosowania wybranych leków modulujących czynność układu współczulnego (w tym: leków blokujących receptor beta-adrenergiczny i iwabradyny) lub antagonistów kanału wapniowego. Badania te prowadzono z wykorzystaniem takich zwierząt doświadczalnych jak: króliki oraz szczury normotensyjne z normo- i hipercholesterolemią. Wykazano m.in. znaczący wpływ symwastatyny na chronotropowoujemne działanie iwabradyny bez względu na występowanie zaburzeń lipidowych u szczurów. Obserwowany efekt zwolnienia rytmu serca po łącznym podaniu iwabradyny z symwastatyną był zależny od dawki statyny. Takiego nasilenia działania chronotropowoujemnego nie zaobserwowano w przypadku łącznego podania symwastatyny w różnych dawkach z metoprololem. Wykazano, że czas i droga podania metoprololu oraz wielkość dawki statyny nie mają znaczącego wpływu na wartości ciśnienia tętniczego i częstość rytmu serca, bez względu na występowanie zaburzeń lipidowych. Ponadto odnotowano korzystny wpływ symwastatyny na poprawę wydolności mięśnia sercowego w warunkach przewlekłego podawania diltiazemu u królików. Badania te prowadziłam w ramach prac projektów badawczych: *Poszukiwanie mechanizmów pozalipidowego działania statyn; Ocena wpływu dawki i czasu podawania simwastatyny na parametry hemodynamiczne oraz rytm serca u szczurów bez zaburzeń lipidowych przed oraz po zahamowaniu receptorów beta-1 adrenergicznych* (UM Łódź). Wyniki prowadzonych w tym kierunku eksperymentów przedstawiłam w 8 publikacjach oryginalnych oraz w 3 doniesieniach na konferencjach naukowych w kraju i zagranicą. Za dwie z powyższych prac otrzymałam naukową zespołową nagrodę Rektora w 2013 roku.

W roku 2010 Zakład Biofarmacji podjął współpracę z Instytutem Ogrodnictwa w Skierniewicach w ramach grantu współfinansowanego przez Unię Europejską z Europejskiego Funduszu Rozwoju

Regionalnego w ramach Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka, N. UDA-POIG.01.03.01-10-109/08-00: *Opracowanie innowacyjnych produktów i technologii dla ekologicznej uprawy roślin sadowniczych*. Jej efektem było rozpoczęcie przeze mnie tematyki badawczej związanej z oceną działania uczulającego owoców. Do prac doświadczalnych, w których uczestniczyłam, wykorzystano model albinotycznych świnek morskich. Ich celem była ocena bezpieczeństwa, w aspekcie potencjalnego działania uczulającego, różnych odmian owoców pochodzących z upraw ekologicznych, w których zastosowano innowacyjne technologie (kierownik podzadania badawczego: Prof. dr hab. Daria Orszulak-Michalak). Powyższe badania prowadzono równolegle do, podjętych przez inny zespół, badań klinicznych we wspólnym zadaniu: *Wpływ spożywania owoców wytworzonych metodami ekologicznymi na kondycję zdrowotną konsumentów*. Ryzyko pojawienia się zmian skórnych w następstwie ekspozycji skórnej i pokarmowej badałam u świnek morskich m.in. z wykorzystaniem testu Magnusona-Kligmana oraz punktowego testu skórno Dreborga. Badania przeprowadziłam na 9 odmianach 3 gatunków owoców. W odniesieniu do większości z nich nie wykazałam wpływu odmiany oraz warunków uprawy na ryzyko pojawienia się reakcji skórnych w następstwie narażenia miejscowego (test M-K, test Dreborga) lub przewlekłej ekspozycji drogą pokarmową. Wynikiem powyższej współpracy są 3 publikacje oryginalne i przeglądowe (2 kolejne publikacje w przygotowaniu), a rezultaty prowadzonych eksperymentów prezentowałam w formie doniesień ustnych oraz posterowych na 7 zjazdach i konferencjach, w kraju i zagranicą.

Inny nurt mojej pracy naukowej związany był z tematyką zajęć prowadzonych na Wydziale Farmaceutycznym UM w Łodzi (opieka farmaceutyczna nad pacjentem chorym przewlekle) i dotyczył opieki nad pacjentem z chorobą nowotworową. W ramach współpracy z Oddziałem Medycyny Paliatywnej Szpitala Bonifratrów w Łodzi uczestniczyłam w prospektywnym badaniu obserwacyjnym jakości życia hospitalizowanych pacjentów w terminalnej fazie choroby. Badanie było prowadzone w latach 2007-2009 w ramach kierowanego przeze mnie projektu: *Opieka paliatywna w Polsce i Wielkiej Brytanii nad pacjentami z chorobą nowotworową ze szczególnym uwzględnieniem farmakoterapii*. Obejmowało ono analizę porównawczą jakości życia pacjentów chorych z niedrobnokomórkowym nowotworem płuca, sutka, gruczołu krokowego i jelita grubego oraz ocenę wpływu świadczeń zapewnionych w zakresie opieki paliatywnej na redukcję poszczególnych objawów somatycznych, sprawność fizyczną, stan emocjonalny pacjentów oraz jakość życia w ich subiektywnej ocenie. Jednym z narzędzi badawczych były formularze QLQ-C15-PAL. Wyniki podjętej pracy przedstawiłam w 4 publikacjach oryginalnych i poglądowych. W jednej z nich poruszyłam także aspekt stosowania standardów i wytycznych postępowania terapeutycznego w organizacji opieki

paliatywnej. Odniosłam się do rekomendacji unijnych oraz modeli funkcjonujących w innych państwach, ze szczególnym uwzględnieniem Wielkiej Brytanii.

Powyższe badania były związane były z moimi zainteresowaniami rolą farmaceuty w procesie opieki farmaceutycznej nad pacjentem chorym przewlekle. W efekcie powyższych zainteresowań powstało 11 prac o charakterze popularyzatorskim opublikowanych głównie w czasopismach dla aptekarzy. Poruszały one szereg aspektów dotyczących bezpieczeństwa farmakoterapii, zjawiska nieprzestrzegania zaleceń lekarskich (*non-adherence*), prawidłowego stosowania wybranych grup produktów leczniczych i wyrobów medycznych oraz innych problemów związanych z farmakoterapią takich chorób przewlekłych jak: astma, cukrzyca i nadciśnienie tętnicze.

Jestem laureatem dwóch nagród naukowych Rektora Uniwersytetu Medycznego w Łodzi (2012, 2013) a także wyróżnień na Konferencjach Naukowych, w tym na Ogólnopolskiej Konferencji Sekcji Krążenia Płucnego Polskiego Towarzystwa Kardiologicznego w Krakowie (II Nagroda i wyróżnienie; 2014).

4. Omówienie działalności dydaktycznej

Od chwili zatrudnienia w Zakładzie Biofarmacji na Wydziale Farmaceutycznym UM w Łodzi w roku 2003 czynnie uczestniczę w prowadzonych zajęciach dydaktycznych zarówno w ramach szkolenia przed- jak i podyplomowego. W ramach szkolenia przeddyplomowego prowadzę zajęcia dla studentów kierunku farmacja, m.in. z przedmiotów: *Opieka farmaceutyczna w wybranych jednostkach chorobowych* (jestem współautorem programu) i *biofarmacja*. Jestem także współautorem programów 15-godzinnych zajęć fakultatywnych: *Farmacja weterynaryjna*; *Biofarmaceutyczne aspekty farmakoterapii pediatrycznej i geriatrycznej*; *Promocja zdrowia w aptece ogólnodostępnej*; *Farmacja kliniczna* dla studentów IV oraz V roku Wydziału Farmaceutycznego UM w Łodzi. Prowadzę także zajęcia dla studentów studiów doktoranckich, słuchaczy studiów podyplomowych oraz dla magistrów farmacji w ramach szkoleń ciągłych i szkoleń specjalizacyjnych w dziedzinie farmacji aptecznej (*Opieka farmaceutyczna*; *Farmakokinetyka stosowana*). Jestem autorem siedmiu wykładów metodą e-learning wyłonionych na drodze konkursu w ramach Projektu *Opracowanie i wdrożenie programów kształcenia z zakresu medycyny i farmacji metodą e-learning na Uniwersytecie Medycznym w Łodzi*.

W latach 2004-2014 byłam opiekunem 22 prac magisterskich wykonywanych przez studentów Uniwersytetu Medycznego, w tym studentki Pauliny Plichty – laureatki 1. miejsca w Wydziałowym Konkursie Prac magisterskich w roku 2014. Jestem promotorem pomocniczym pracy doktorskiej magister Mileny Korczak („Wpływ nefarmakologicznych metod terapii schorzeń układu ruchu na

stosowanie leków i jakość życia u pacjentów w sanatoriach: Busko-Zdrój”). Efektem pracy w kole naukowym dla studentów kierunku farmacja są 3 wspólne publikacje naukowe.

Podejmuję działania organizacyjne zarówno w obrębie Zakładu, w którym pracuję, jak i Wydziału Farmaceutycznego UM w Łodzi. Jestem członkiem Oddziału Łódzkiego Polskiego Towarzystwa Farmakologicznego, gdzie od 2007 roku pełnię funkcję sekretarza, a także członkiem Oddziału Łódzkiego Polskiego Towarzystwa Farmaceutycznego, Ogólnopolskiej Sekcji Opieki Farmaceutycznej Polskiego Towarzystwa Farmaceutycznego. Uczestniczę w organizowaniu posiedzeń naukowo-szkoleniowych ww. towarzystw, studiów podyplomowych *Farmacja Medyczna* oraz kursów specjalizacyjnych dla farmaceutów z dziedziny farmacji aptecznej na Wydziale Farmaceutycznym UM w Łodzi. W latach 2009-2012 pełniłam funkcję koordynatora systemu Wirtualna Uczelnia – UXP, uczestnicząc także w licznych spotkaniach poświęconych procesowi wdrażania systemu na Uniwersytecie Medycznym w Łodzi.

Jestem członkiem Okręgowej Izby Aptekarskiej w Łodzi. Biorę udział w popularyzowaniu nauk farmaceutycznych oraz promocji Uniwersytetu Medycznego w Łodzi prowadząc zajęcia m.in. dla uczniów szkół ponadgimnazjalnych i słuchaczy Uniwersytetu III Wieku, publikując materiały przeglądowe w czasopismach popularnonaukowych dla aptekarzy oraz wygłaszając odczyty na posiedzeniach naukowo-szkoleniowych ww. towarzystw.

Szczegółowe informacje na temat mojej działalności naukowej i dydaktycznej są przedstawione w załączonym „Wykazie opublikowanych prac naukowych lub twórczych prac zawodowych oraz informacji o osiągnięciach dydaktycznych, współpracy naukowej i popularyzacji nauki” (Załącznik 3)

5. Wykaz skrótów i definicji użytych w Autoreferacie

Skrót	Pełna nazwa angielska	Pełna nazwa polska
6MWD	six-minute walk distance	dystans 6 minutowego marszu
BNP	brain natriuretic peptide	peptyd natriuretyczny typu B
cGMP	cyclic guanosine monophosphate	cykliczny guanozynomonofosforan
CH	chronic hypoxia	przewlekłe niedotlenienie
CO	cardiac output	pojemność minutowa
CTEPH	chronic thromboembolic pulmonary hypertension	przewlekłe zakrzepowo-zatorowe nadciśnienie płucne
DABP	diastolic arterial blood pressure	rozkurczowe ciśnienie tętnicze krwi

EGFR	epidermal growth factor receptor	receptor naskórkowego czynnika wzrostu
eNOS	endothelial nitric oxide synthase	śródbłonkowa syntaza tlenku azotu
ERA	endothelin receptor antagonist	antagonista receptora endotelinowego
ET-1	endothelin type 1	endotelina 1
FDA	Food and Drug Administration	Agencja ds. Żywności i Leków
HDL	high density lipoprotein	lipoproteiny wysokiej gęstości
HMG-CoA	3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA	3-hydroxy-3-metylo-glutarylo-koenzym A
HR	heart rate	częstość akcji serca
IP	prostacyclin receptor	receptor prostacykliny
LDL	low density lipoprotein	lipoproteiny niskiej gęstości
MABP	mean arterial blood pressure	średnie ciśnienie tętnicze krwi
MCT	monocrotaline	monokrotalina
mPAP	mean arterial pulmonary hypertension	średnie ciśnienie w tętnicy płucnej
MKP-1	mitogen-activated protein kinase phosphatase-1	fosfataza-1 kinaz aktywowanych miogenami
PAH	pulmonary arterial hypertension	tętnicze nadciśnienie płucne
PASMC	pulmonary artery smooth muscle cell	komórka mięśni gładkich tętnicy płucnej
PDE-5i	phosphodiesterase type 5 inhibitor	inhibitor fosfodiesterazy typu 5
PDGF	platelet - derived growth factor	platekopochozny czynnik wzrostu
PDGFR	platelet - derived growth factor receptor	receptor platekopochoznego czynnika wzrostu
PGI2	prostacyclin	prostacyklina
PGIS	prostacyclin synthase	syntaza prostacykliny
PH	pulmonary hypertension	nadciśnienie płucne
PPAR	peroxisome proliferator-activated receptor	receptor aktywowany proliferatorami peroksysomów
PVR	pulmonary vascular resistance	naczyniowy opór płucny
RAAS	renin-angiotensin-aldosterone system	układ renina-angiotensyna-aldosteron
ROCK	Rho-associated kinase	kinaza zależna od Rho

RTK	receptor tyrosine kinase	receptor kinazy tyrozynowej
RVH	right ventricle hypertrophy	przerost prawej komory mięśnia sercowego
RVP	right ventricle pressure	ciśnienie w prawej komorze serca
SABP	systolic arterial blood pressure	skurczowe ciśnienie tętnicze krwi
sGC	soluble guanylate cyclase	rozpuszczalna cyklaza guanylowa
TKI	tyrosine kinase inhibitor	inhibitor kinazy tyrozynowej
TXA-2	thromboxane A2	tromboksan A2
VEGF	vascular endothelial growth factor	czynn timerostu śródbłona naczyń
VSMC	vascular smooth muscle cells	komórki mięśni gładkich ścian naczyń
WHO	World Health Organization	Światowa Organizacja Zdrowia

Magdalena Jasińska - Stroschein

 dr n. farm. Magdalena Jasińska-Stroschein