

Wrocław, 19 kwietnia 2021r.

dr hab. n. med., mgr farm. Łukasz Dobrek
Adiunkt
Katedra i Zakład Farmakologii Klinicznej
Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu

Recenzja rozprawy doktorskiej pt.:

„Zastosowanie modeli zwierzęcych w poszukiwaniu substancji o potencjalnym działaniu terapeutycznym w nadciśnieniu płucnym. Ilościowa analiza meta-danych z badań przedklinicznych”

autorstwa mgr farm. Katarzyny Szutki

realizowanej pod kierunkiem dr hab. n. farm. Magdaleny Jasińskiej-Stroschein

w Zakładzie Biofarmacji Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

Nadciśnienie płucne (ang. pulmonary hypertension; PH) jest nieprawidłowym wzrostem średniego ciśnienia w tętnicy płucnej, oznaczanego podczas cewnikowania prawego serca, przekraczającym 25 mmHg w spoczynku oraz 30 mmHg w wysiłku, występującym w przebiegu różnych schorzeń płuc, naczyń płucnych oraz serca. Choroba ma wieloczynnikową etiologię i złożoną patogenezę, finalnie prowadzącą do uszkodzenia i dysfunkcji śródbłonna naczyń płucnych, zaburzeń krzepnięcia, nieprawidłowej regulacji napięcia ściany naczyń płucnych oraz aktywacji stanu zapalnego, związanego z proliferacją komórek śródbłonna, miofibroblastów i komórek mięśni gładkich, powodujących przebudowę struktury ściany naczyń i wzrost płucnego oporu obwodowego. W Europie, PH występuje u około 15 osób / 1 milion dorosłych osób i finalnie prowadzi do wystąpienia przewlekłej niewydolności krążenia pochodzenia sercowego, ze zmniejszeniem średniego czasu przeżycia. Leczenie PH jest ukierunkowane na korektę zaburzeń pozostających w ścisłym związku z chorobą podstawową, wtórnie doprowadzających do PH oraz na kontrolę wartości ciśnienia w łożysku płucnym oraz zmniejszanie patologicznego remodelingu naczyń płucnych. Relatywnie niewielkie, aktualne możliwości farmakologicznej interwencji łagodzącej objawy i zmniejszającej progresję PH uzasadniają prowadzenie badań przedklinicznych, mających na celu selekcję potencjalnych, nowych opcji farmakoterapeutycznych, weryfikowanych w późniejszych etapach badań klinicznych.

Celami przedstawionej do recenzji pracy doktorskiej były ocena poprawności eksperymentalnych modeli nadciśnienia płucnego w odwzorowywaniu tego schorzenia, jak i analiza efektywności nowych substancji leczniczych z różnych klas farmakologicznych, obecnie badanych za pomocą wyżej wspomnianych, ocenianych modeli zwierzęcych.

Powyższe cele zostały zrealizowane w oparciu o szczegółową ocenę statystyczną wyników badań pozyskanych z przeprowadzonego przeglądu systematycznego piśmiennictwa, w oparciu o przyjęte kryteria selekcji, z wykorzystaniem meta-analiz oraz analiz metaregresji wieloczynnikowej, uzupełnionych o analizy oceny błędów publikacji. Recenzowana dysertacja nie jest zatem stricte pracą eksperymentalną, samodzielnie wykonaną przez Doktorantkę na zwierzętach laboratoryjnych, pod kontrolą Promotora, lecz jest rozprawą opartą na szczegółowej i wnikliwej analizie statystycznej wyników pozyskanych z opublikowanych badań eksperymentalnych.

Przygotowanie rozprawy doktorskiej było poprzedzone publikacją części wyników w postaci dwóch prac oryginalnych w recenzowanych czasopismach (Pharmacol Res; 2017 oraz Vascul Pharmacol; 2018) oraz jednej pracy przeglądowej (Post Hig Med. Dosw; 2018), jak i 3 komunikatów zjazdowych. Tym samym, Doktorantka spełniła wymóg formalny, wskazany w art. 186 ust. 1 pkt 3a Ustawy Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce z dnia 20 lipca 2018r. (Dz. U. 2018 poz. 1668), precyzujący konieczność opublikowania co najmniej jednego artykułu naukowego w recenzowanym czasopiśmie naukowym, jako wstępny warunek nadania stopnia naukowego doktora. Moim zdaniem, na podkreślenie zasługuje fakt, iż wspomniane wyżej prace oryginalne, będące podstawą przedstawionej rozprawy doktorskiej, ukazały się w renomowanych czasopismach, posiadających relatywnie wysoki Impact Factor (odpowiednio 4,897 oraz 3,330). Wraz ze wspomnianą wyżej publikacją przeglądową, łączny Impact Factor opublikowanych przez Doktorantkę we współautorstwie z Promotorem prac wynosi 9,333, a aktualna punktacja MNiSW wspomnianych artykułów wynosi 240 pkt (zgodnie z Komunikatem Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 31 lipca 2019 r. w sprawie wykazu czasopism naukowych i recenzowanych materiałów z konferencji międzynarodowych). Należy uznać to za imponujący wynik, biorąc pod uwagę, iż dotyczy Osoby będącej zapewne wciąż u progu swojej dalszej kariery naukowej, jak i świadczy o wysokiej ocenie naukowej przedstawianych w dysertacji wyników, pozytywie zrecenzowanych i przyjętych finalnie do publikacji w zagranicznych czasopismach.

Rozprawa doktorska przygotowana przez Panią mgr farm. Katarzynę Sztukę, pod kierunkiem Pani dr hab. farm. Magdaleny Jasińskiej-Stroschein liczy 150 stron, a wraz z dwoma załącznikami umieszczonymi pod koniec monografii liczy 186 stron. Dysertacja rozpoczyna się teoretycznym wstępem podającym również cele pracy (rozdziały 1 i 2), następnie podano

charakterystykę części doświadczalnej – czyli w tym przypadku szczegółowy opis założeń i realizacji analizy statystycznej oraz uzyskane wyniki (rozdział 3), dalej wyodrębniono dyskusję oraz wnioski stanowiące odpowiednio rozdział 5 i 6. Końcowe fragmenty rozprawy stanowią rozdziały 6-10, będące odpowiednio streszczeniem, anglojęzycznym abstraktem, wykazem rycin, oraz wykazem tabel zamieszczonych w tekście dysertacji. Praca doktorska zawiera także dwa załączniki, z których pierwszy stanowi szczegółową listę bibliograficzną 290 publikacji naukowych będących podstawą przeprowadzonych meta-analiz, natomiast załącznik 2 to cztery tabele, z czego Tabela 1 stanowi krótką charakterystykę wspomnianych powyżej prac, podając rok publikacji każdego z artykułów, gatunek zwierzęcia laboratoryjnego służącego do wywołania eksperymentalnego modelu PH, rodzaj metody indukcji PH wraz z dawką zastosowanych związków i czasem trwania indukcji PH oraz oceniane w danej publikacji parametry opisujące PH. Pozostałe tabele podają klasyfikację testowanych związków opisywanych w zakwalifikowanych do metaanaliz pracach eksperymentalnych (Tabela 2) oraz zbiorczo podsumowują wpływ tychże związków na wartości wybranych parametrów hemodynamicznych (średnie ciśnienie w tętnicy płucnej, prawokomorowe skurczowe ciśnienie tętnicze, przerost mięśnia prawej komory oraz grubość ściany prawej komory), wyrażając efekt łączny leczenia jako różnicę (Tabela 3) bądź iloraz średnich (Tabela 4).

W części teoretycznej Autorka krótko opisała klasyfikację kliniczną i epidemiologię nadciśnienia płucnego oraz krótko przedstawiła patomechanizmy wspomnianego schorzenia, skupiając się na zaburzeniach związanych ze szlakiem endoteliny, prostacykliny oraz tlenu azotu. W kolejnym fragmencie Doktorantka krótko scharakteryzowała główne opcje terapeutyczne, oparte na farmakologicznej ingerencji we wspomniane wyżej szlaki sygnalizacyjne (prostanoidy oraz agoniści receptora dla prostacykliny, antagoniści receptorów endotelinowych, inhibitory fosfodiesterazy typu 5, stymulatory cyklicznej guanylowej). W kolejnym podrozdziale Autorka opisała postępy w patofizjologicznym opisie nadciśnienia płucnego, wskazując jednocześnie potencjalne miejsca działania nowych związków o spodziewanej aktywności farmakologicznej w nadciśnieniu płucnym, koncentrując się na układzie renina-angiotensyna-aldosteron, układzie kinaz tyrozynowych, lokalnym stanie zapalnym przebiegającym wraz z nadmiernym stresem oksydacyjnym, układzie kinaz RhoA/ROCK, układzie serotonergicznym, receptorach PPAR- γ oraz przekaźnictwie adrenergicznym związanym z receptorami β_1 i β_3 . Krótki fragment poświęcony został również mechanizmom epigenetycznym. Końcową część opisu teoretycznego stanowi charakterystyka zwierzęcych modeli wykorzystywanych w badaniach przedklinicznych, ze szczególnym uwzględnieniem modeli klasycznych (indukowanych monokrotaliną lub ekspozycją na przewlekłe niedotlenienie) oraz alternatywnych (model monokrotalinowy połączony z resekcją jednego płuca, model Sugenu –

inhibitora receptora 2 czynnika wzrostu śródbłonna naczyń, model oparty na wywołaniu wad wrodzonych prawego serca lub modele genetyczne).

Część doświadczalna (rozdział 3) opisuje metodykę zaplanowanych analiz i rozpoczyna się od graficznego przedstawienia etapów analiz zgodnie z protokołem PRISMA. W dalszych fragmentach Doktorantka szczegółowo podała kryteria włączenia, jak i wyłączenia publikacji branych pod uwagę przy planowanych badaniach statystycznych. W kolejnym fragmencie wymieniono dane pozyskiwane z zakwalifikowanych publikacji oraz jakościowe kryteria oceny zakwalifikowanych do badań artykułów. Rozdział 3 zawiera także szczegółowy opis statystyczny przeprowadzanych metaanaliz.

Kolejną częścią rozdziału 3 jest szczegółowy opis wyników dotyczących wyszukiwania, identyfikacji i selekcji publikacji na potrzeby przeprowadzanych metaanaliz, co ponownie zostało przedstawione w formie diagramu PRISMA. Następnie Doktorantka scharakteryzowała badania z zakwalifikowanych publikacji pod kątem użytych zwierząt laboratoryjnych, zastosowanego modelu nadciśnienia płucnego oraz przyjętego schematu badania, rodzaju badanych związków w danym eksperymencie, ocenianych parametrów oraz dokonała analizy oceny jakości zakwalifikowanych badań. Rozdział ten zawiera również szczegółowe wyniki przeprowadzonych analiz w postaci tabelarycznej oraz rycin.

W kolejnym rozdziale – Dyskusji, Autorka ponownie przywołała cele swoich analiz i zweryfikowała postawione hipotezy badawcze. Pierwszym, zasadniczym celem, jaki realizowała Doktorantka była jakościowa i ilościowa ocena wpływu składowych charakteryzujących dany model eksperymentalny nadciśnienia płucnego na rozwój tego schorzenia. Aby rozwiązać tę kwestię badawczą Doktorantka sformułowała dwie hipotezy badawcze. Pierwsza z nich zakładała, iż zwierzęce modele nadciśnienia płucnego są zróżnicowane, zarówno pod kątem metody wywoływania (zatem zależne od rodzaju, dawki, sposobu podania czynnika indukującego), jak i czasu indukcji schorzenia oraz wykorzystywanych zwierząt laboratoryjnych. Przeprowadzona analiza wykazała, iż większość publikacji opierała się na klasycznych metodach indukcji modelu nadciśnienia płucnego, związanych z ekspozycją na niedotlenienie lub i.p. / s.c. podanie monokrotaliny w dawce 60 mg/kg m.c.. Niemal wszystkie oceniane interwencje doświadczalne były przeprowadzone z użyciem szczurów laboratoryjnych, zwłaszcza szczepu Sprague-Dawley. Drugą z hipotez przyjętą przez Doktorantkę zakładała, iż ciężkość zmian hemodynamicznych charakteryzujących dany eksperymentalny model nadciśnienia płucnego zależy od przyjętego w danym doświadczeniu modelu zwierzęcego. Przeprowadzone analizy wykazały, iż zastosowanie modeli alternatywnych wiązało się z wywołaniem bardziej zaawansowanych i nieodwracalnych zmian patomorfologicznych w tętnicach płucnych. W klasycznym modelu PH indukowanym monokrotaliną, zaawansowanie zmian patofizjologicznych zależało od dawki monokrotaliny, z optymalną wynoszącą 60 mg/kg m.c. badanego zwierzęcia.

Przeprowadzone przez Doktorantkę analizy wykazały również zależność między czasem trwania indukcji PH a zaawansowaniem zmian przerostowych i zaburzeń hemodynamicznych oraz ujawniły, iż wywoływane zaburzenia zależały od gatunku użytych do badań zwierząt eksperymentalnych, ze słabiej zaakcentowanymi zmianami u myszy, w porównaniu do szczurów oraz od wpływu ewentualnego stosowanego środka anestetycznego.

Drugim, zasadniczym celem, jaki postawiła sobie Doktorantka, była jakościowa i ilościowa ocena efektywności nowych związków, testowanych w badaniach opisanych w zakwalifikowanych do metaanaliz publikacjach. Hipotezą, jaką weryfikowała Autorka w tym kontekście było założenie, iż rodzaj zastosowanego w badaniach przedklinicznych modelu zwierzęcego PH może wpływać na efektywność ocenianych związków, ocenianą w dysertacji za pomocą różnicy średnich oraz ilorazu średnich. Wykonane analizy ujawniły, iż największym wpływem na poprawę ocenianych parametrów cechowały się badane aktywatory kanałów potasowych ATP-zależnych (iptakalim podawany w schemacie prewencyjnym), inhibitory szlaku RhoA/ROCK (fasudil), regulatory aktywności RAAS (aktywatory ACE2) oraz związki o działaniu przeciwzapalnym – nienasycone kwasy tłuszczowe n-3 i inhibitory NF- κ B. Istotną konkluzją wykonanych analiz było również wykazanie, iż różnorodność modeli zwierzęcych stosowanych w badaniach przedklinicznych determinuje rozwój nadciśnienia płucnego o różnym stopniu ciężkości, co pośrednio wpływa na ocenę skuteczności terapeutycznej związków o spodziewanej aktywności farmakologicznej w tym schorzeniu. Kluczowe zatem znaczenie w aspekcie prac eksperymentalnych poświęconych PH ma dobór właściwego modelu zwierzęcego oraz schematu badawczego (prewencyjnego lub terapeutycznego).

Z obowiązku pełnienia funkcji recenzenta, chciałbym również wspomnieć o drobnych usterkach, które zauważyłem podczas lektury dysertacji Pani mgr farm. Katarzyny Sztuki.

Uwagi merytoryczne:

- W części teoretycznej (Rozdział 2), przy definiowaniu i klasyfikacji nadciśnienia płucnego, można było jeszcze, obok klasyfikacji klinicznej, krótko scharakteryzować klasyfikację patofizjologiczną, uwzględniającą istnienie kilku typów nadciśnienia płucnego, biorąc pod uwagę przeważający patomechanizm (czynne, bierne, hiperkinetyczne, obstrukcyjne, obliteracyjne, idiopatyczne)
- W podrozdziale 2.2.1., przy dyskusji organizacji układu RAA, można było jeszcze krótko wspomnieć o dodatkowych szlakach w obrębie tego układu, np. związanych z syntezą angiotensyny 1-9, angiotensyny III i angiotensyny IV
- W podrozdziale 2.1.5. (Farmakoterapia) opisano bardziej szczegółowo leki swoiste stosowane w PH, korygujące dysfunkcję śródbłonna i działające przeciwproliferacyjnie, czyli prostacyklinę i

jej analogi, antagonistów receptorów endotelinowych, inhibitory fosfodiesterazy typu 5, stymulatory cykazy guanylowej oraz agonistów receptorów dla prostacykliny. Wcześniej, w tekście tego podrozdziału wspomniano o lekach z grupy antagonistów wapnia, które są stosowane u pacjentów z PH z zachowaną reaktywnością naczyń płucnych w ostrym teście hemodynamicznym, oceniającym zmniejszenie średniego ciśnienia w tętnicy płucnej po zastosowaniu wziewnie tlenu azotu lub iloprostu bądź po dożylnym podaniu adenozyliny lub epoprostenolu. W ramach opisywanego w tym podrozdziale postępowania farmakologicznego, można było jeszcze dodać krótki fragment o adiuwantowym leczeniu PH, uwzględniającym podawanie antykoagulantów doustnych w tętnicznym i zakrzepowo-zatorowym PH, tlenoterapii stosowanej w hipoksemicznym PH, diuretyków i digoksynie w biernym PH związanym z przewlekłą niewydolnością prawokomorową. Warto było również hasłowo wspomnieć o pozafarmakologicznych, inwazyjnych metodach leczenia ciężkich przypadków PH, jak: septostomia przedsionkowa, endarterektomia płucna, przezskórna balonowa plastyka naczyń płucnych lub przeszczepienie obu płuc / wykonanie przeszczepu płucoserca.

- Str. 60 – zamieszczono informację, iż do analizy efektywności terapeutycznej potencjalnych leków w terapii PH (etap IIIC) zakwalifikowano 285 artykułów (522 interwencji) oraz iż odrzucono 5 publikacji z uwagi na zastrzeżenia wymienione dalej w teście rozprawy. Natomiast w Tabeli 1; stanowiącej fragment Załącznika 1, umieszczono 290 publikacji, będących podstawą wykonania analiz oceniających aspekty metodyki badanych modeli zwierzęcych na rozwój i ciężkość zaburzeń patofizjologicznych opisujących PH, nie zaznaczając, z których pięciu prac zrezygnowano na etapie oceny efektywności potencjalnych leków.

- Miejscami, sformułowania w tekście rozprawy doktorskiej są niejasne, np.:

str. 19 (...) W warstwie mięśniowej i śródbłonkowej tętnic płucnych oraz w zmianach splotowatych pacjentów z PH dochodzi do podwyższenia endoteliny (...) – czy chodzi tutaj o wzrost endoteliny w neuronach splotów?

Str. 20 (...) Poprzez aktywację kinazy białkowej A, cAMP powoduje zwiększenie zewnątrzkomórkowego stężenia jonów Ca^{2+} , co prowadzi do rozkurczu mięśni gładkich (...) – czy cAMP rzeczywiście bezpośrednio powoduje zmiany stężenia jonów Ca^{2+} w przestrzeni zewnątrzkomórkowej?

Str. 24 (...) W tym ostatnim przypadku może dochodzić do rozwoju miejscowego stanu zapalnego na przebiegu cewnika (...) – czy rzeczywiście chodzi o możliwość rozwoju stanu zapalnego w obrębie cewnika?

Str. 52 (...) W razie potrzeby, wartości danych odczytywano z wykresów (...) – czy wykresy w publikacjach nie podających w tekście wartości liczbowych rzeczywiście były zaopatrzone w dokładne skale umożliwiające odczytanie konkretnej wartości, czy też jednak wówczas przyjmowana była wartość przybliżona?

Str. 52 (...) – w podrozdziale 3.1.3.1. podano informację, iż w oparciu o 8 kryteriów punktowych, każda z publikacji była oceniana, a wartości łącznych wyników były podstawą do opracowania listy podsumowującej jakość zakwalifikowanych publikacji. W tym samym podrozdziale wymieniono jednak wcześniej 9 kryteriów. Czy oznacza to, iż 9-ta przesłanka (wartość współczynnika Impact Factor; IF) nie była jednak brana pod uwagę przy ocenie jakości publikacji? Czy też wartość IF była składową finalnej wartości przypisywanej danej publikacji?

Uwagi o charakterze redakcyjnym i korektorskim:

- Przede wszystkim, w całym tekście, zwraca uwagę – nieszczęśliwie moim zdaniem – nagminnie używany termin „antagonisty”; „agonisty” w miejsce „antagoniści” i „agoniści” (np. str. 24 (...) Antagonisty receptorów endotelinowych to kolejna grupa leków...; str. 26 (...) Agonisty receptora prostacykliny IP (...) w miejsce: Agoniści receptora prostacykliny). Terminy „antagonisty” i „agonisty” są konsekwentnie stosowane przez Doktorantkę w całym tekście, sądzę, iż wymagałoby to jednak poprawy.

- Podobnie, zwraca uwagę nieprecyzyjność zastosowanych terminów w wybranych fragmentach rozprawy doktorskiej, na przykład: str. 35 (...) Aktywatory PPARy stały się celem terapii przeciwnowotworowych (...) – w odniesieniu do ligandów receptorowych należałoby jednak stosować określenia „agoniści”; „antagoniści”, lecz nie aktywatory. Analogicznie, na stronie 44 pada określenie (...) Sugen 5416 jest inhibitorem receptora typu 2 czynnika wzrostu śródbłonna naczyniowego (...) – sądzę, iż bardziej zasadne byłoby określenie tego związku jako antagonisty wspomnianego receptora.

- Na stronach: 42, 44, 46 pada określenie „maskularyzacja”, stosowane w opisie migracji i proliferacji komórek mięśni gładkich, akumulacji fibroblastów, miofibroblastów i składników macierzy zewnątrzkomórkowej, co przyczynia się do patologicznej przebudowy ściany naczynia – moim zdaniem bardziej poprawnym terminem tutaj wydaje się termin „muskularyzacja”.

- W niektórych miejscach pracy spotyka się drobne literówki, np. str. 36 (...) Podobnie jak w komórkach nowotworowych (...) zamiast „Podobnie jak w komórkach nowotworowych”. ; str. 21 (...) Dobór tzw. leków swoistych wiąże się z zakwalifikowaniem pacjenta (...) zamiast „Dobór tzw. leków swoistych wiąże się z zakwalifikowaniem pacjenta...”.

Przedstawione wyżej drobne zastrzeżenia nie zmieniają mojej wysokiej oceny pracy doktorskiej Pani mgr farm. Katarzyny Sztuki. Doceniam bardzo duży nakład pracy, jaką Doktorantka niewątpliwie musiała wykonać, dokonując tak szerokiego przeglądu piśmiennictwa, wykonując tak złożoną i kompleksową analizę statystyczną oraz drobiazgowo i starannie opisując uzyskane wyniki.

Reasumując, stwierdzam, iż rozprawa doktorska Pani mgr farm. Katarzyny Sztuki spełnia przesłankę opisaną w Ust. 2. Art. 187 Ustawy Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce, stanowiącą, iż (...) przedmiotem rozprawy doktorskiej jest oryginalne rozwiązanie problemu naukowego (...). Moim zdaniem należy uznać, iż Doktorantka wykazała się umiejętnościami naukowymi, polegającymi na określeniu celów swoich analiz, postawieniu i weryfikacji hipotez badawczych, dokonaniu zaawansowanego przeglądu piśmiennictwa i selekcji prac zgodnie z uprzednio przyjętym protokołem oraz przeprowadzeniu krytycznej dyskusji uzyskanych wyników i wyciągnięciu wniosków.

Stąd, wnioskuję do Wysokiej Rady Nauk Farmaceutycznych Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów postępowania doktorskiego, wszczętego celem nadania stopnia naukowego w dyscyplinie nauki farmaceutyczne Pani mgr farm. Katarzynie Sztuce.

SPECJALISTA FARMAKOLOGII
SPECJALISTA FARMACJI KLINICZNEJ
Lukasz Dobrek
Dr hab. n. med. *Lukasz Dobrek*