



Warszawa, 1.10. 2018 r.

Dr hab. n. med. Urszula Mackiewicz, prof. nadzw. CMKP

OCENA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Ilek. Katarzyny Kodziszewskiej

p.t. „Układ peptydów natriuretycznych- poziom ekspresji i ocena funkcjonalna w niewydolności mięśnia sercowego”

wykonanej w Klinice Niewydolności Serca i Transplantologii
Instytutu Kardiologii w Warszawie

pod promotorską opieką **dr hab. n. med. Przemysława Leszka, prof. nadzw. Instytutu Kardiologii w Warszawie**

Jednym z głównych elementów patofizjologii niewydolności serca (NS) jest przewlekła aktywacja neurohormonalna, obejmująca przede wszystkim aktywację układu współczulnego (SNS), oraz osocznego i tkankowego układu renina-angiotensyna-aldosteron (RAAS). Dochodzi również do aktywacji układu wazopresynergicznego, zwiększonej produkcji endotelin i prozapalnych cytokin (IL-1, IL-6 i TNF- α) oraz do zwiększonej syntezy peptydów natriuretycznych (NP) A, B i C (ANP, BNP, CNP).

Bodziec uszkadzający, prowadzący do utraty liczby funkcjonalnych kardiomiocytów lub ich przeciążenia, prowadzi do kompensacyjnej aktywacji SNS i RAAS. Rzeczywiście aktywacja tych układów, zwiększając kurczliwość serca i częstość rytmu oraz prowadząc do skurczu tętniczek oporowych i wzrostu objętości krwi krążącej pozwala, w początkowej fazie choroby, na zachowanie pojemności minutowej serca. Jednak przewlekła aktywacja tych układów, z którą mamy do czynienia w przypadku trwałego uszkodzenia lub przeciążenia mięśnia sercowego prowadzi do uruchomienia szeregu niekorzystnych efektów, takich jak wzrost obciążenia wstępnego i następczego, zwiększone zapotrzebowanie mięśnia sercowego na tlen, przerost, włóknienie, nekroza, apoptoza i zaburzenia rytmu. Te konsekwencje przewlekłej aktywacji neurohormonalnej prowadzą do wtórnego uszkodzenia serca i progresji NS. Leki zmniejszające aktywację układu SNS i RAAS są podstawą terapii farmakologicznej NS. Z kolei, zwiększona synteza NP przez kardiomiocyty przedsionków i komór w odpowiedzi na wzrost obciążenia wstępnego i następczego, a także przez poddany

stresowi śródbłonek naczyniowy wywiera szereg korzystnych efektów, takich jak wazodylatacja, zmniejszona retencja sodu i wody (spadek obciążenia wstępnego i następczego), działanie antywłóknieniowe, antyprzerostowe, i co bardzo ważne, hamowanie aktywacji RAAS i SNS. Pomimo tego, że stężenie NP w osoczu pacjentów z NS jest istotnie podniesione i dodatnio koreluje ze stopniem zaawansowania choroby, wydaje się być nadal niewystarczające do złagodzenia skutków nadmiernej aktywacji SNS i RAAS. Badania nad zwiększeniem efektywności NP w NS trwają od lat. Po wielu nieskutecznych próbach udało się opracować nowy lek będący jednocześnie inhibitorem obojętnej endopeptydazy (NEP) rozkładającej NP i inhibitorem receptora angiotensynowego AT1 (ARNI), o potwierdzonej skuteczności w badaniu klinicznym PARADIGM –HF. Nadal jednak trwają poszukiwania metod skutecznego zwiększania efektywności NP u pacjentów z NS.

Wiedza o wszystkich elementach złożonego układu NP, obejmującego dotychczas poznane cztery peptydy natriuretyczne, 3 typy receptorów, NEP, a także białka zaangażowane w potranslacyjne modyfikacje NP, jak koryna, furyna, czy DDT –IV, pochodzi głównie z badań prowadzonych w modelach zwierzęcych. Wiedza na temat układu NP w niewydolnym sercu ludzkim jest nadal fragmentaryczna i niepełna. Nieliczne prace przeprowadzone na niewielkich i heterogennych grupach pacjentów z NS nie dają pełnego wglądu w działanie i efektywność całego układu.

Doktorantka mając świadomość tych deficytów jako nadrzędny cel pracy obrała szczegółową charakterystykę osi NP w niewydolnym sercu ludzkim. Liczne cele szczegółowe pokazują jak szeroko pomyślane jest to badanie. Doktorantka postanowiła zbadać ekspresję na poziomie mRNA i białka, trzech peptydów natriuretycznych ANP, BNP i CNP oraz 3 receptorów dla NP (NRP-A, NRP-B, NRP-C). Ponadto zaplanowała badania pozwalające ocenić funkcję tych receptorów oraz zbadać ekspresję i aktywność NEP w celu oceny pozareceptorowej eliminacji NP.

Bardzo wysoko oceniam wybór celu rozprawy oraz bardzo ambitne i kompleksowe podejście do zagadnienia. Uważam, że **Cel rozprawy** jest uzasadniony naukowo, dotyczy zagadnienia o istotnym znaczeniu poznawczym, i co bardzo ważne, o realnym potencjale klinicznym. Lepsze zrozumienie złożonej osi NP u pacjentów z NS jest niezbędne do rozwijania nowych strategii terapeutycznych ukierunkowanych, podobnie jak ARNI, na zwiększenie efektywności tego układu w NS, co może przyczynić się do poprawy skuteczności leczenia i komfortu życia pacjentów.

Przedłożona mi do oceny praca ma typowy dla rozpraw doktorskich układ. Zawiera 108 stron, 19 rycin i 5 tabel. Cytowanych jest 163 pozycji literatury. Opatrzona jest streszczeniem w języku polskim i angielskim. Rozprawę rozpoczyna obszerny 20

stronicowy **Wstęp**. Doktorantka szczegółowo i systematycznie opisuje mechanizmy syntezy, potranslacyjnych modyfikacji oraz eliminacji NP. Z dużą świadomością omawia wewnątrzkomórkowe szlaki sygnalizacyjne uruchamiane w wyniku aktywacji poszczególnych receptorów dla NP. Bardzo rzeczowo opisuje również dotychczasowe próby modyfikacji osi NP w badaniach podstawowych i klinicznych. Wstęp rozprawy niewątpliwie świadczy o bardzo dużej wiedzy Autorki w obszarze prowadzonych badań. Z obowiązku Recenzenta wskazuję drobny błąd, który znajduje się na Rycinie 4, ilustrującej szlaki sygnalizacyjne uruchamiane w następstwie aktywacji receptorów dla NP, na której wskazano, że wzrost cGMP prowadzi do aktywacji kinazy białkowej C (PKC), zamiast kinazy białkowej G (PKG).

Opis **Materiału i Metod** użytych w pracy stanowi odrębny, 9 stronicowy rozdział. Doktorantka w swojej pracy wykorzystowała tkankę mięśnia sercowego pobraną z serc eksplantowanych pochodzących od 43 pacjentów oraz tkankę pobraną z serc 13 zmarłych dawców, których serca z różnych przyczyn nie zostały wykorzystane do przeszczepienia. Dodatkowo dysponowała fragmentami aorty pobranymi od 17 pacjentów z NS i od 8 zdrowych dawców. Etiologia NS była zróżnicowana, z przewagą kardiomiopatii rozstrzeniowej i niedokrwiennej.

Doktorantka stosując standardowe metody biochemiczne (RT-PCR, ELISA) oznaczyła ekspresję genów na poziomie mRNA i na poziomie białka dla NP i ich receptorów. W preparatach błon komórkowych zbadala funkcje NPR-A i NPR-B, mierząc stężenie cGMP powstałego w wyniku ich stymulacji przy użyciu syntetycznych peptydów (odpowiednio ANP i CNP). Ponadto zbadala funkcję sygnalizacyjną NPR-C mierząc stężenie cAMP i IP3 powstających w odpowiedzi na stymulację receptora za pomocą swoistego agonisty, cANF4-23. Stężenie cAMP i IP3 przyjmowała za miarę aktywacji odpowiednio AC i PLCβ. Stężenie cAMP mierzono przy użyciu komercyjnego testu ELISA, a ilość IP3 za pomocą licznika scyntylicyjnego (radioaktywny IP3 powstawał ze znakowanego endogennego substratu). Aktywność NEP oznaczono fluorescencyjnie. **Opis metod badawczych użytych w pracy** jest jasny i czytelny, a jednocześnie przy metodologii bardziej złożonej na tyle szczegółowy, aby można było zrozumieć charakter wykonywanych pomiarów.

Wysoko oceniam część metodyczną pracy, a w szczególności taki **dobór metod, który pozwolił Doktorantce na wszechstronną ocenę funkcjonalną układu NP. Na szczególne uznanie zasługuje wykorzystanie w pracy bardzo cennego materiału ludzkiego. Dodatkowo należy podkreślić, że w tego typu badaniach liczba serc w poszczególnych grupach (NS i kontrola) jest zazwyczaj niższa niż w przedstawionej mi do oceny pracy.**

Ilość uzyskanych przez Doktorantkę **Wyników** jest imponująca. Doktorantka przedstawiła je na 11 kilkupanelowych rycinach i w 4 tabelach. Doktorantka wykazała, że:

- Ekspresja genów ANP i BNP na poziomie mRNA i na poziomie białka jest istotnie wyższa w tkance niewydolnego mięśnia sercowego niż w sercach kontrolnych. Ekspresja receptora dla tych peptydów (NPR-A) jest niezmienną na poziomie mRNA i białka, jednak jego funkcja jest istotnie obniżona.
- Ekspresja genu CNP na poziomie mRNA jest obniżona, podczas gdy jego ekspresja na poziomie białka umiarkowanie, ale istotnie statystycznie podwyższona. Z kolei, zarówno ekspresja genu receptora dla NPR-B na poziomie mRNA i białka, jak i jego funkcja są niezmienną.
- Ekspresja NEP jest niezmienną, jednak jej aktywność jest większa w sercach niewydolnych niż w sercach kontrolnych.
- W tkance niewydolnego mięśnia sercowego ekspresja genu NPR-C na poziomie mRNA istotnie rośnie, a na poziomie białka maleje w porównaniu do serc kontrolnych, co może sugerować zwiększoną internalizację receptora pod wpływem nadmiaru ligandów w NS. NPR-C nie wykazuje funkcji sygnalizacyjnej w mięśniu sercowym, pełniąc w nim prawdopodobnie przede wszystkim funkcję klirensową. Z kolei NPR-C posiada taką funkcję w naczyniach. Wydaje się, że w naczyniach kontrolnych jego aktywacja hamuje AC, a w sercach niewydolnych ją aktywuje, co może sugerować „przepinanie” tego receptora na inne niż Gi podtypy białka G.

Doktorantka dodatkowo przeanalizowała uzyskane wyniki w kontekście etiologii NS, wyodrębniając dwie podgrupy serc niewydolnych: NS o etiologii niedokrwiennej i innej niż niedokrwienna. Pokazała, że ekspresja NEP i NPR-C na poziomie białka jest większa w NS o etiologii niedokrwiennej niż w NS o etiologii innej niż niedokrwienna.

Uważam, że wyniki uzyskane przez Doktorantkę są wyjątkowo interesujące i nowatorskie. Doktorantka po raz pierwszy w tkance ludzkiej zbadała:

- ekspresję CNP i wszystkich trzech receptorów dla NP na poziomie białka;
- funkcję sygnalizacyjną receptora NPR-C w tkance mięśnia sercowego i w aorcie;
- aktywność NEP w zależności od etiologii NS.

W moim odczuciu wkład przedstawionej mi do oceny rozprawy w poszerzenie wiedzy o osi NP w niewydolnym sercu ludzkim jest bardzo istotny. Dopiero dane dotyczące ekspresji genu na poziomie białka, a tym bardziej pomiar funkcji poszczególnych białek pozwalają na wnioskowanie o realnym wpływie zaobserwowanej zmiany na patofizjologię mięśnia sercowego. Wykonanie badania ekspresji tylko na poziomie

mRNA, co najczęściej spotyka się w pracach przeprowadzanych na materiale ludzkim, w rzeczywistości dostarcza niewielu informacji.

W kontekście implikacji klinicznych najciekawsze wydają się trzy obserwacje. Pierwsza z nich to zachowana funkcja NPR-B przy obniżonej funkcji NPR-A. Obserwacja ta kieruje szczególną uwagę na CNP i potrzebę zwiększania jego stężenia w NS, ponieważ to ten peptyd ma do dyspozycji sprawny funkcjonalnie receptor. Wynik ten tłumaczy również niepowodzenia wcześniej testowanych terapii polegających na próbach podawania syntetycznych peptydów typu A i B. Po drugie, w moim odczuciu bardzo ważna jest obserwacja o braku funkcji sygnalizacyjnej NPR-C w mięśniu sercowym. Sugeruje to, że blokowanie tego receptora będzie miało wpływ wyłącznie na jego funkcję klirensową i zmniejszy degradację NP, bez ingerencji w dwa bardzo ważne sygnalizacyjnie szlaki w kardiomiocytach (zależne od AC i PLC β), których efekt modulacji byłby wielokierunkowy i trudny do przewidzenia. Po trzecie, wzrost ekspresji NEP i NPR-C w NS o etiologii niedokrwiennej, może sugerować większą eliminację NP i potrzebę bardziej agresywnego ich blokowania w tej grupie chorych. Wszystkie powyżej wymienione obserwacje wskazują potencjalne cele terapeutyczne w obszarze układu NP.

Z obowiązku Recenzenta wskazuję kilka uwag dotyczących prezentacji wyników:

- W moim odczuciu sformułowanie „aktywność podstawowa” (odpowiednio GC, AC i PLC β) na rycinach 13 A i B, 15A i B, 16A i B oraz 17 nie jest precyzyjne. Wyżej wymienione ryciny w rzeczywistości prezentują stężenia wtórnych przekaźników (odpowiednio cGMP, cAMP i IP3) w warunkach podstawowych (bez stymulacji) a nie aktywność enzymów.
- W opisie użytych analiz statystycznych Doktorantka deklaruje zastosowanie typowych testów statystycznych dla danych wykazujących rozkład normalny lub nie wykazujących takiego rozkładu. Prezentacja wyników sugeruje jednak, że wszystkie dane zostały przedstawione jako wartości średnie z podaniem odchyłeń standardowych (czyli w sposób typowy dla rozkładów normalnych), a nie jako mediany i odstępów międzykwartylowe.
- W opisie poszczególnych eksperymentów nie wszędzie została podana liczba (n) serc użytych do wykonania oznaczeń.
- Czy fragmenty tkanki mięśnia sercowego do badań biochemicznych i funkcjonalnych były pobierane zawsze z tego samego obszaru lewej komory, zarówno w sercach niewydolnych jak i kontrolnych? Doniesienia wskazują, że ekspresja poszczególnych genów na poziomie mRNA i białka może być odmienna i zależna od lokalizacji i lokalnego naprężenia w ścianie mięśnia sercowego.

Dyskusja jest 16 stronicowym opracowaniem, w którym Doktorantka z dużą świadomością omawia swoje wyniki i konfrontuje je z doniesieniami literaturowymi. Dyskusja z całą stanowczością świadczy o dużej wiedzy Doktorantki w obszarze omawianych zagadnień i starannej analizie prac z tego obszaru, prowadzonych zarówno w modelach zwierzęcych, jaki i u ludzi, a także dużej dojrzałości naukowej i krytycznym podejściu do uzyskanych wyników. Dyskusja jest mocną stroną rozprawy. Na podstawie uzyskanych wyników Doktorantka sformułowała **Wnioski** w postaci 12 punktów. W moim odczuciu są one raczej podsumowaniem wyników. Z kolei kilka bardzo cennych wniosków znalazło się w podsumowaniach poszczególnych podrozdziałów dobrze napisanej dyskusji.

Otrzymane przez Doktorantkę bardzo ciekawe i nowatorskie wyniki stymulują do zadawania pytań o mechanizmy.

- Doktorantka szczegółowo zbadała funkcję sygnalizacyjną receptora NPR-C, pomijając jego ważną funkcję klirensową. Czy Doktorantce znane są metody pomiaru aktywności klirensowej NPR-C i czy możliwe byłoby jej zdaniem przeprowadzenie pomiaru tej funkcji receptora w posiadanym materiale?
- Jaki jest w układzie sercowo naczyniowym względny udział NPR-C i NEP w eliminacji NP?
- Jaki może być zdaniem Doktorantki mechanizm spadku funkcji NPR-A w NS (defosforylacja, spadek glikozylacji)? Czy w literaturze przedmiotu dostępne są wyniki badań wskazujące na zmianę lokalizacji i zaburzoną dimeryzację NPR-A w NS?
- Faktem jest, że oba receptory NPR-A i NPR-B posiadają domenę o aktywności GC a ich aktywacja prowadzi do wzrostu poziomu cGMP i aktywacji PKG. Jednak aktywacja każdego z receptorów wywiera nieco inne efekty komórkowe, szczególnie w kontekście rozkurczu kardiomiocytów. Ten fakt może mieć istotne implikacje kliniczne, wskazując na receptor, którego stymulacja mogłaby przynieść największe korzyści chorym z zaburzeniami rozkurczu. Proszę Doktorantkę o ustosunkowanie się do tego zagadnienia, również w kontekście uzyskanych przez nią wyników (spadek funkcji NPR-A i zachowana funkcja NPR-B).

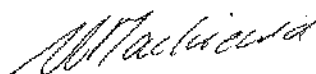
Reasumując, rozprawę doktorską lek. Katarzyny Kodziszewskiej oceniam bardzo wysoko. Wyniki, które przedstawiła są nowatorskie, poszerzają istotnie wiedzę o układzie peptydów natriuretycznych w niewydolnym sercu ludzkim. Badania zawierają udaną próbę poszukiwania mechanizmów spadku efektywności NP w NS, a nie są tylko opisem zjawisk. Wyniki pracy mogą mieć potencjalne zastosowanie

kliniczne i przyczynić się do skutecznego leczenia chorych z NS i pozwolić na bardziej precyzyjną i świadomą ingerencję w układ NP. Bardzo ważne jest to, że znaczna część wyników została już opublikowana w czasopiśmie (*International Journal of Cardiology*) o wysokim współczynniku oddziaływania (IF =4.034) co potwierdza ich znaczenie i nowatorstwo. Ponadto publikacja zawierająca pozostałe wyniki dotyczące roli NPR-C i NEP została już przygotowana i pozostaje w procesie recenzyjnym w tym samym czasopiśmie.

Ostatecznie stwierdzam, że rozprawa doktorska lek. Katarzyny Kodziszewskiej spełnia wszystkie wymogi stawiane rozprawom na stopień doktora wymienione w art.13, ust. 1 i 2 *Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65 poz. 595, z późn. zmianami)*. W związku z tym, z pełnym przekonaniem, **zwracam się do Wysokiej Rady Naukowej Instytutu Kardiologii w Warszawie o dopuszczenie lek. Katarzyny Kodziszewskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

Jednocześnie z uwagi na wysoką wartość rozprawy, fakt opublikowania wyników w prestiżowym czasopiśmie naukowym, nowatorstwo badań, doskonały warsztat metodyczny, unikalny materiał badawczy oraz uzyskanie wyników o potencjalnym znaczeniu klinicznym, **wnoszę do Wysokiej Rady Naukowej Instytutu Kardiologii w Warszawie wniosek o wyróżnienie rozprawy.**

Kierownik Studium Studiów Doktoranckich
Centrum Medycznego Kształcenia Podyplomowego



dr hab. n. med. Urszula Machewicz, prof. CMKP