



Prof. dr hab. n. farm. Ewa Chabielska
Zakład Biofarmacji i Radiofarmacji
Uniwersytet Medyczny w Białymstoku
ul. Mickiewicza 2C
15-222 Białystok
tel. 085 748 56 07
e-mail: ewa.chabielska@umb.edu.pl

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

**pt. „ Ocena roli neprylizyny i farmakologicznego zahamowania jej aktywności
w zwierzęcym modelu kardiotoxyczności antracyklin ”**

wykonanej przez lek. Aleksandrę Marię Sobiborowicz-Sadowską
w Katedrze i Zakładzie Fizjologii Doświadczalnej i Klinicznej
Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego.

Promotor: Prof. dr hab. n.med. Agnieszka Cudnoch-Jędrzejewska

Promotor pomocniczy: dr n.med. Katarzyna Kamińska

Ocena merytoryczna rozprawy

Toksyczność sercowo-naczyniowa jako częsta konsekwencja działań niepożądanych współczesnej terapii przeciwnowotworowej jest poważnym problemem klinicznym. Pomimo, że powikłania kardiologiczne indukowane antracyklinami są opisywane od ponad 60 lat ich diagnostyka, prewencja i leczenie pozostają przedmiotem badań. Poznanie patomechanizmów kardiotoxyczności antracyklin, możliwości jej prewencji oraz monitorowania terapii jest zagadnieniem nadal aktualnym i ważnym znaczeniu poznawczym oraz aplikacyjnym.

Monitorowanie funkcji serca przed terapią, w trakcie i po zakończeniu leczenia umożliwia nie tylko modyfikację farmakoterapii przeciwnowotworowej, ale także pozwala na włączenie właściwego leczenia kardiologicznego. W tych działaniach wykorzystuje się coraz doskonalsze metody nieinwazyjnego obrazowania morfologii i funkcji serca oraz pomiary we krwi biochemicznych markerów.

W dysfunkcji serca związanej z leczeniem onkologicznym zaleca się stosowanie kilku grup leków, do których należą: inhibitory konwertazy angiotensyny II (ACE-I), antagoniści receptora typu 1 dla angiotensyny II, beta-adrenolityki, inhibitory kotransportera sodowo—glukozowego typu-2 oraz antagoniści receptora mineralokortykoidowego. Zainteresowanie klinicystów i badaczy nauk podstawowych budzą korzystne w niewydolności serca z obniżoną frakcją wyrzutową efekty działania połączenia lekowego tj.: antagonisty receptora angiotensyny II typu 1 i inhibitora neprylizyny (ARNI - sakubitryl/walsartan). Leki te poza hamowaniem niekorzystnych w obrębie serca i naczyń działań angiotensyny II, obniżają aktywność neprylizyny (NEP), enzymu uczestniczącego w proteolizie peptydów wazoaktywnych, w tym także natriuretycznych (NP). Wykazano w badaniach klinicznych, iż pacjenci leczeni ARNI charakteryzują się niższym ryzykiem hospitalizacji z powodu zaostrzenia niewydolności serca

oraz zgonu z przyczyn sercowo-naczyniowych. Ponadto ARNI wykazuje korzystny profil działań niepożądanych (vs ACE-I), za wyjątkiem objawowej hipotensji. Korzystne klinicznie i potwierdzone w pojedynczych badaniach podstawowych działania ARNI są również powodem zainteresowania rolą nerylizyny w patogenezie chorób układu krążenia. W tym świetle temat przedstawionej mi do recenzji rozprawy doktorskiej lek. Aleksandry Sobiborowicz-Sadowskiej jest ważny i w pełni uzasadniony.

Doktorantka wykonała nowatorskie badania zmian aktywności, ekspresji i poziomu NEP w lewej komorze serca szczura (LV) w toku rozwoju kardiotoxyczności antracyklinowej (AIC). Podjęła też próbę oceny użyteczności wolnej postaci NEP (sNEP) jako biomarkera ryzyka wystąpienia AIC. Ponadto, opierając się na danych dowodzących, że ARNI w dawce hipotensyjnej chroni przed wystąpieniem dysfunkcji skurczowej lewej komory serca u zwierząt eksperymentalnych, zaplanowała złożone eksperymenty, w których oceniała kardioprotekcyjne działania ARNI w dawce nie powodującej przedłużonego spadku ciśnienia tętniczego. Do realizacji starannie zaplanowanych badań Doktorantka wykorzystwała uznane w badaniach podstawowych modele AIC wywołanej doksorubicyną (DOX) u szczurów szczepu Sprague Dawley (SPRD) oraz metodologię, między innymi, z zakresu nieinwazyjnego obrazowania serca, histologii, biologii molekularnej i biochemii. Wytyczyła następujące szczegółowe cele badań:

- ocenę zmian aktywności enzymatycznej, ekspresji i poziomu białka NEP w LV oraz zależności między tymi parametrami a stopniem nasilenia zmian w badaniu echokardiograficznym i histopatologicznym w modelu ostrej i przewlekłej AIC
- ocenę aktywności i stężenia sNEP w surowicy i zależności między tymi parametrami a stopniem nasilenia zmian w badaniu echokardiograficznym i histopatologicznym w modelu ostrej i przewlekłej AIC
- ocenę wpływu farmakoterapii ARNI w dawce niehipotensyjnej, na indukowaną DOX kardiotoxyczność w modelu przewlekłej AIC
- wstępną ocenę efektów działania sakubitrylu podanego w monoterapii na indukowaną DOX kardiotoxyczność w modelu przewlekłej AIC

Doktorantka wykazała, w modelu ostrej AIC, obniżenie echokardiograficznych wykładników kurczliwości LV. W badaniu histopatologicznym zauważyła silne zwyrodnienie kardiomiocytów wyrażone głównie w postaci wakuolizacji cytoplazmy. Oceniając po raz pierwszy zmiany NEP w LV nie wykryła zmian w ekspresji mRNA oraz poziomu białka NEP przy istotnym spadku aktywności enzymatycznej NEP. Nie zaobserwowała wpływu podania DOX na stężenie sNEP w surowicy ani korelacji między stężeniem sNEP a echokardiograficznymi wykładnikami kurczliwości LV oraz sumarycznym indeksem histopatologicznego uszkodzenia śródsierdza. Stwierdzała natomiast silną dodatnią korelację między stężeniem sNEP a stopniem nasilenia wakuolizacji cytoplazmy komórek śródsierdza.

W modelu przewlekłej ekspozycji na DOX, wykazała znaczącą dysfunkcję skurczową serca. W badaniu histopatologicznym potwierdziła uszkodzenie miokardium wyrażone przede wszystkim wysokim stopniem nasilenia zwłóknienia śródmiąższowego oraz naciekiem komórek jednojądrzastych. Oceniając po raz pierwszy zmiany NEP w LV nie stwierdziła zmian ekspresji mRNA oraz aktywności enzymatycznej NEP przy jednoczesnym spadku poziomu białka NEP. W tym modelu również nie wykazała różnic w stężeniu sNEP w surowicy ani

korelacji między stężeniem sNEP a histopatologicznym stopniem uszkodzenia mięśnia sercowego. Wykazała natomiast ujemną korelację między stężeniem sNEP a wartościami stosunku SV/TL (objętość wyrzutowa/długość kości piszczelowej) oraz CO/TL (pojemność minutowa/ długość kości piszczelowej) przy braku korelacji między stężeniem sNEP w surowicy a wartościami LVEF (frakcji wyrzutowej lewej komory serca) i LVFS (frakcji skracania lewej komory serca).

W kolejnym etapie badań dowiodła, że 4-tygodniowe podanie ARNI (sakubitryl/walsartan) od pierwszej doby indukcji AIC, w dawce 20 mg/kg, raportowanej jako dawka niehipotensyjna, zwiększa wartości echokardiograficznych parametrów wydolności skurczowej LV bez wpływu na charakterystyczne w przebiegu AIC zmiany EKG. Wykazała znaczne ograniczenie stopnia zwłóknienia śródmiąższowego i nacieków komórek jednojądrzastych w miokardium. Towarzyszył temu działaniu ARNI spadek stężenia cTnI (troponiny sercowej I). Kolejne nowatorskie wyniki badania wstępnego dotyczące 4 tygodniowego podawania wyłącznie sakubitrylu pokazują korzystne wartości parametrów echokardiograficznych oraz niższe nasilenie wykładników toksycznego uszkodzenia miocardium u leczonych zwierząt.

Doktorantka ostrożnie konkluduje swoje odkrycia twierdząc, iż zmniejszona aktywność enzymatyczna NEP w modelu ostrej AIC oraz spadek poziomu białka NEP w modelu przewlekłej AIC nie dowodzi związku ze stopniem nasilenia AIC. Uważa także, że zależności między stężeniem sNEP w surowicy a nasileniem zmian degeneracyjnych kardiomiocytów (w modelu ostrej AIC) oraz stopniem obniżenia niektórych parametrów echokardiograficznych (w modelu przewlekłej AIC) wskazuje na udział sNEP w procesach patofizjologicznych w przebiegu AIC. Stwierdza też, iż sNEP nie stanowi prawdopodobnie użytecznego biomarkera w ocenie AIC. Konstatuje dalej, że ARNI w niskiej dawce najprawdopodobniej chroni przed wystąpieniem uszkodzenia mięśnia sercowego związanego z chronicznym podaniem DOX u szczurów SPRD. Przychylam się do rozważnych wniosków Doktorantki i pragnę podkreślić nowatorskie wyniki prezentowane w rozprawie dotyczące roli neprylizyny w rozwoju zwierzęcego modelu kardiotoxyczności antracyklin. Z pewnością znaczenie sNEP jako biomarkera jest na tym etapie badań trudne do oceny, zważywszy na niską liczebność grup. Bezspornie jednak wszystkie otrzymane i statystycznie opracowane wyniki zachęcają, podobnie jak wyniki badania pilotażowego z inhibitorem neprylizyny w pierwotnej prewencji AIC, do szerzej zaplanowanych eksperymentów dotyczących monitorowania i leczenia kardiotoxyczności poantracyklinowej. Sądzę, że przed publikacją manuskryptu, warto zwrócić uwagę na fakt występowania różnic w wartościach niektórych parametrów w modelu AIC w drugiej części badania (redukcja dawki DOX) vs części Ib badania. Do tych parametrów zaliczam np.: spadek śmiertelności zwierząt (12,5% vs 36,36%), spadek HR (16% vs 26%) czy niższy indeks HP (10 pkt vs 14 pkt). Te różnice charakteryzują model przewlekłej AIC w zależności od dawki DOX i ustosunkowanie się do nich w części dyskusyjnej rozprawy byłby bardzo cenne.

Ocena formalna rozprawy

Pracę doktorską wykonano w ramach projektu „TIME 2 MUW doskonałość dydaktyczna szansą rozwoju Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego” współfinansowanego z Europejskiego Funduszu Społecznego w ramach Programu Operacyjnego Wiedza Edukacja Rozwój na lata 2014-2020. Do rozprawy została dołączona uchwała II Lokalnej Komisji Etycznej do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach w Warszawie.

Rozprawa licząca 145 stron została napisana w postaci monografii o układzie typowym dla takiego opracowania. Pragnę podkreślić dużą przejrzystość rozprawy i uporządkowany wywód naukowy. Rozprawę podzielono na rozdziały, rozpoczynając od rozdziału „SPIS TABEL I RYCIN” kolejno umieszczono „WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW”, „STRESZCZENIE” i „ABSTRACT”. Dalej znajduje się 27-stronicowy „WSTĘP”, w którym Doktorantka w oparciu o najnowsze dane omawia zagadnienie kardi toksyczności antracyklin oraz charakteryzuje neprelizynię, zwracając uwagę na potencjalne możliwości wykorzystania jej jako biomarkera oraz celu farmakologicznego hamowania w niewydolności serca w prewencji i przebiegu AIC. Wstęp rozprawy dowodzi rzetelnego naukowego przygotowania Doktorantki do badań nad tezami rozprawy doktorskiej oraz umiejętności krytycznej oceny tekstu naukowego i formułowania hipotez. Następny rozdział „ZAŁOŻENIA I CELE PRACY” zawiera takie kluczowe elementy jak uzasadnienie wyboru tematyki pracy i spójne z hipotezami szczegółowe cele badań. Kolejny, rozdział „MATERIAŁ I METODY” liczący 18 stron, zawiera szczegółowy opis metod i protokołów badań. Następny, najdłuższy, 33 stronicowy, rozdział rozprawy „WYNIKI” zawiera, opisane szczegółowo i przedstawione graficznie na 34 rycinach i w 9 tabelach rezultaty badań. Zwrócił moją uwagę brak reprezentatywnych dla poszczególnych grup zdjęć preparatów histopatologicznych lewej komory serca mięśnia sercowego. Przeprowadzona analiza statystyczna jest adekwatna do rodzaju analizowanych zmiennych. Rozdział „DYSKUSJA” liczy 15 stron i jest podzielony tematycznie na podrozdziały opisujące kolejne etapy badań. Doktorantka w sposób dojrzały omawia rezultaty badań, dobrze wpisując je w kontekst własnych hipotez badawczych i dotychczasowych, często nielicznych danych. Pragnę zwrócić uwagę na krytyczną analizę wyników oraz zwrócenie uwagi na ograniczenia metodologiczne, które są szczegółowo omówione w dalszym rozdziale rozprawy pt. „OGRANICZENIA PRACY”. W rozdziale „WNIOSKI” Doktorantka przedstawiła 9 wniosków (8 wniosków odnoszących się do dwóch pierwszych części pracy i 1 wniosek podsumowujący część drugą). Sformułowano je, co oceniam wysoko, z dużą dozą ostrożności, zważywszy na liczebność grup i ograniczenia metodyczne. Ten rozdział zamyka trzydziestonasto „PODSUMOWANIE” rozprawy, które jest *de facto* ogólnymi wnioskami płynącymi z badań Doktorantki. W kolejnym wspomnianym wcześniej rozdziale „OGRANICZENIA PRACY” Doktorantka komentuje ograniczenia związane z drogą podania DOX, specyfiką pomiaru frakcji wyrzutowej lewej komory u szczura i niedoskonałością metody pomiaru aktywności enzymatycznej sNEP w surowicy. Ta analiza dowodzi dużej wiedzy merytorycznej Doktorantki i umiejętności spojrzenia na pracę badawczą z rozwagą. W rozdziale „PIŚMIENNICTWO” znajduje się 320 dobrze dobranych merytorycznie pozycji bibliograficznych obejmujących kilka dekad, poczynając od pierwszych doniesień o wpływie antracyklin na mięsień sercowy. W tekście rozprawy są drobne usterki językowe i redakcyjne, co nie zmienia jego merytorycznego znaczenia.

Konkluzja

Wysoko oceniam rozprawę doktorską lek. Aleksandry Marii Sobiborowicz-Sadowskiej pt. „Ocena roli neprylizyny i farmakologicznego zahamowania jej aktywności w zwierzęcym modelu kardiotoxyczności antracyklin”. Rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2018 poz. 1668). Wobec powyższego, zwracam się do Rady Dyscypliny Nauk Medycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego z u doktorskiego.

Podkreślając takie zalety rozprawy jak: postawienie oryginalnych hipotez badawczych, dobrze zaprojektowane eksperymenty oraz nowatorskie wyniki badań wnioskuję o wyróżnienie rozprawy doktorskiej.

Prof. dr hab. Ewa Chabielska

Białystok, 14 lipca, 2023