

Prof. dr hab. Barbara Malinowska  
ZAKŁAD  
FIZJOLOGII I PATOFIZJOLOGII  
DOŚWIADCZALNEJ  
Uniwersytet Medyczny w Białymstoku  
15-089 BIAŁYSTOK  
ul. MICKIEWICZA 2A  
tel/fax (+85) 7485699  
e-mail: barbara.malinowska@umb.edu.pl



DEPARTMENT  
OF EXPERIMENTAL PHYSIOLOGY  
AND PATHOPHYSIOLOGY  
Medical University of Białystok  
15-089 BIAŁYSTOK  
MICKIEWICZ Str. 2A  
POLAND  
tel./fax (48-85) 7485699

**Ocena pracy doktorskiej mgr farm. Tasnima Mohaissena**

**pt.: „Novel mechanisms of peripheral endothelial dysfunction  
in heart failure in Tgαα\*44 mice”.**

**“Nowe mechanizmy dysfunkcji śródbłonna naczyń obwodowych  
w niewydolności mięśnia sercowego u myszy Tgαα\*44”**

Zaliczana do chorób cywilizacyjnych niewydolność mięśnia sercowego wciąż wymaga dalszych badań zarówno jeżeli chodzi o jej etiopatogenezę jak i konieczność wskazania nowych trendów terapeutycznych. Prawidłowo działający niezwykle aktywny fizjologicznie śródbłonek naczyniowy zapewnia m.in. homeostazę układu krążenia, a jego dysfunkcja jest nie tylko jednym z pierwszych objawów szeregu chorób układu krążenia; ale także ma istotną wartość prognostyczną w odniesieniu do śmiertelności i hospitalizacji z powodu niewydolności serca i to niezależnie od etiologii choroby. Biorąc powyższe pod uwagę tematyka przedstawionej mi do oceny pracy doktorskiej mgr farm. Tasnim Mohaissen jest zarówno aktualna jak i celowa. Pragnę w tym miejscu podkreślić, że praca jest kontynuacją niezwykle bogatego dorobku wybitnego specjalisty z zakresu farmakologii śródbłonna Promotora pracy, Pana prof. dr hab. Stefana Chłopickiego.

Licząca 109 stron praca doktorska napisana jest w języku angielskim, za wyjątkiem polskojęzycznego streszczenia. Na uwagę zasługuje fakt, że wchodzące w jej skład badania zostały sfinansowane ze środków uzyskanych m.in. z kierowanego przez Doktorantkę grantu Preludium (NCN), a także z grantów kierowanych przez Promotora Team Tech-Core Facility (finansowane przez FNP) i Maestro (NCN). Co ważne, przedstawione w pracy wyniki zostały już częściowo opublikowane w 2022 r. w prestiżowym Cardiovascular Research (Mohaissen T, Proniewski B, Targosz-Korecka M, Bar A, Kij A, Bulat K, Wajda A, Błat A, Matyjaszczyk-Gwarda K, Grosicki M, Tworzydło A, Sternak M, Wojnar-Lason K, Rodrigues-Diez R, Kubisiak A, Briones A, Marzec KM, Chłopicki S. *Temporal relationship between systemic endothelial dysfunction and alterations in erythrocyte function in a murine model of chronic heart failure. doi: 10.1093/cvr/cvab306.*). Doktorantka wskazuje na powyższą publikację w legendach niektórych rycin, z tym, że podaje rok 2021, gdyż zapewne w międzyczasie rok wydania uległ zmianie. Pragnę zaznaczyć, że Doktorantka jest pierwszym autorem tej napisanej przez polsko-hiszpańską grupę badawczą publikacji

o Impact Factor równym aż 14.239 pkt., co niewątpliwie świadczy o Jej wiodącej roli, zaangażowaniu i kompetencji przy powstawaniu tej pracy.

W 14-stronicowym logicznym wstępie, który zawiera dodatkowo 6 kolorowych przejrzystych ilustracji przybliżających omawiane w tekście zagadnienia, Doktorantka w oparciu o wyniki doświadczeń na zwierzętach oraz, w miarę możliwości, uzyskane także u pacjentów, szczegółowo przedstawia czytelnikowi głównych bohaterów i zagadnienia swojej pracy doktorskiej:

(1) **śródbłonek naczyń krwionośnych**, jego znaczenie w homeostazie układu krążenia, pochodzące ze śródbłonka czynniki wazoaktywne oraz fenotyp dysfunkcyjnego śródbłonka (ostatnie dwa zagadnienia przedstawione są także za pomocą rycin);

(2) **główne metody oceny funkcji śródbłonka** za pomocą badań funkcjonalnych i biochemicznych (biomarkery dysfunkcji śródbłonka zostały przedstawione w Tabelce), w tym metody inwazyjne i nieinwazyjne oraz złoty standard FMD (flow-mediated dilation), są to metody stosowane przez Doktorantkę podczas realizacji niniejszej rozprawy;

(3) **znaczenie dysfunkcji śródbłonka w niewydolności serca (HF)**; podkreślając przy tym między innymi, że dysfunkcja śródbłonka w naczyniach obwodowych i to zarówno oporowych jak i transportowych może wskazywać na HF,

(4) przedstawienie złożonego **mechanizmu powstania dysfunkcji śródbłonka w HF** wskazując na czynniki hemodynamiczne, neurohormonalne i immunologiczne (szczegółowo omówione i dodatkowo przedstawione na schemacie); podkreślając przy tym istotne znaczenie układu **renina-angiotensyna-aldosteron (RAAS)** w progresji HF, a także w rozwoju dysfunkcji śródbłonka w naczyniach obwodowych;

(5) omówienie **roli erytrocytów (RBCs) w chorobach układu krążenia**, zwracając uwagę, że sugeruje się, iż są one lepszym wskaźnikiem chorób układu krążenia niż białe krwinki czy płytki krwi; dodatkowo podkreślenie znaczenia **arginazy**, kontrolującej powstawanie NO w komórkach śródbłonka, a występującej m.in. w erytrocytach i zwrócenie uwagi, że w szeregu układu krążenia dochodzi do dysfunkcji RBCs i wzrostu aktywności arginazy, dodatkowo na rycinie przedstawienie czynników zwiększających aktywność arginazy w śródbłonku (w tym m.in. Ang II),

(6) za pomocą odpowiedniego schematu opisanie powstawania Ang II na drodze przemian zależnych i niezależnych od ACE (ryc.), zwrócenie uwagi na **Ang 1-12 i chymazę**.

Całość znacznie ułatwia późniejsze zrozumienie tekstu dalszych części pracy i końcowych wniosków, a przede wszystkim jednoznacznie uzasadnia cel rozprawy doktorskiej oraz dlatego może ona mieć potencjalne znaczenie terapeutyczne w terapii HF. Celem pracy było:

1. opisanie związku pomiędzy rozwojem dysfunkcji śródbłonna naczyniowego, a zmianami zachodzącymi w erytrocytach w trakcie progresji niewydolności serca;
2. określenie wpływu egzogennej Ang-(1-12) i jej konwersji do Ang II na funkcjonowanie śródbłonna obwodowego w HF, ze szczególnym uwzględnieniem znaczenia w tym procesie chymazy i tromboksanu A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) pochodzenia naczyniowego.

Doświadczenia przeprowadzono na bardzo wartościowym, unikalnym mysim modelu przewlekłej HF wywołanej przez specyficzną dla kardiomiocytów nadekspresję aktywowanego białka Gαq (myszy Tgαq\*44). Najważniejsze cechy tego modelu, w tym dotyczące zależnego od wieku mysz zmian w poziomie Ang-(1-12) w sercu, aortalnej i osoczu przedstawione zostały na rycinie. Jako kontrole prawidłowo zastosowano myszy FVB. Na wszystkie doświadczenia uzyskano zgodę Lokalnej Komisji Etycznej ds. Doświadczeń na Zwierzętach w Krakowie. Zastosowanie szeregu wartościowych metod funkcjonalnych, biochemicznych, molekularnych i histologicznych pozwoliło na kompleksową ocenę zachodzących zmian. Co ważne, większość zmian badano w zależności od rozwoju HF, w jego wczesnej, przejściowej i końcowej fazie, stosując myszy 4, 8 i 12-miesięczne. Odpowiedź rozkurczową naczyń oceniano w warunkach *in vivo* oraz *ex vivo* na izolowanych naczyniach. Badano przy tym naczynia transportowe i oporowe, a oceniano odpowiedź zależną i niezależną od śródbłonna [odpowiednio na acetylocholiny (ACh) i nitroprusydek sodu (SNP)]. Precyzyjne i czułe metody biochemiczne (spektroskopia elektronowego rezonansu paramagnetycznego, chromatografia cieczowa w połączeniu ze spektrometrią mas, Western Blot, PCR, Elisa) pozwoliły na otrzymanie szeregu cennych wyników biochemicznych, a zastosowanie szeregu odpowiednich narzędzi farmakologicznych (antagonistów receptorów i inhibitorów enzymów) umożliwiło wyciągnięcie wniosków odnośnie mechanizmów zachodzących zmian.

Duża liczba wyników zestawiona została tematycznie (a także później omówiona w podobny sposób w Dyskusji) w trzech zasadniczych grupach:

(1) funkcja śródbłonna w krążeniu obwodowym, (2) zmiany w erytrocytach i (3) szlak Ang-(1-12)/Ang II/TXA<sub>2</sub> w krążeniu obwodowym. Zostały one przedstawione aż na 26 prawidłowo opisanych rycinach, przy czym większość z nich jest złożona co najmniej z 4 wykresów. Mój niedosyt budzi jedynie zbliżona kolorystyka symboli poszczególnych grup oraz ich zbyt mała wielkość, co trochę utrudnia śledzenie wyników. Każdy podrozdział wyników rozpoczyna krótkie wyjaśnienie celowości danych doświadczeń, co ułatwia zrozumienie ich znaczenia.

W liczącej 16 stron dyskusji (czyli dłuższej niż wstęp, co jest rzadkie w tego typu pracach) Doktorantka omawia uzyskane wyniki w nawiązaniu do trzech faz rozwoju HF u myszy Tgαq\*44. Wykazane przez Doktorantkę oraz we wcześniejszych pracach grupy prof. S. Chłopickiego kompleksowe zmiany zachodzące w progresji HF przedstawione są także na końcowej rycinie. To podsumowujące zestawienie stanowi niewątpliwie dodatkową wartość niniejszej rozprawy, która ułatwi badania dla osób pracujących w przyszłości z tym wartościowym modelem. Między innymi, zgodnie z uzyskanymi wynikami we wczesnej fazie HF pojawiają się zmiany w erytrocytach. Natomiast do dysfunkcji śródbłonna w naczyniach obwodowych i upośledzonej odpowiedzi na Ach, ale nie na SNP, przy czym zależnie od typu naczynia (wyrażna w aorcie, brak w krezkowej i udowej) dochodzi w fazie przejściowej. W tej fazie stwierdzono również znaczące zmiany w budowie erytrocytów, a zahamowanie arginazy odwracało dysfunkcję śródbłonna wywołaną przez erytrocyty wyizolowane od myszy z HF. Oczywiście największe zmiany zaobserwowano w końcowej fazie HF. Stwierdzono m.in. dysfunkcję śródbłonna pod wpływem Ang-(1-12) związane z nasiloną produkcją Ang II i niezależną od chymazy. Jednocześnie w aorcie dochodziło do wzrostu wydzielania TXA<sub>2</sub> pod wpływem Ang II i Ang-(1-12), a osłabiony rozkurcz na Ach były hamowane przez antagonistów receptorów TP dla TXA<sub>2</sub> i AT<sub>1</sub> dla Ang II. Jeżeli chodzi o przyczyny prowadzące do dysfunkcji śródbłonna w naczyniach obwodowych to, jak stwierdza Doktorantka, są one niezależne od czynników hemodynamicznych i zmian zapalnych, a mogą wynikać ze zmian patologicznych w budowie i funkcji erytrocytów, zwiększonej aktywności arginazy oraz wewnątrznaczyniowego szlaku Ang-(1-12)/Ang II/TXA<sub>2</sub>. Dodatkową cenną obserwacją jest fakt, że metoda *in vivo* jest bardziej czuła niż *ex vivo*, gdyż dysfunkcja śródbłonna zauważona była odpowiednio u 8- i 12-miesięcznych myszy.

Praca doktorska zakończona jest trzema wnioskami szczegółowymi i jednym ogólnym. Jedynie w streszczeniu można znaleźć nawiązanie do potencjalnego znaczenia uzyskanych wyników. Doktorantka sugeruje, że arginaza i wewnątrznaczyniowe szlaki Ang-(1-12)/Ang II/TXA<sub>2</sub> mogą stanowić nowy cel terapeutyczny w leczeniu dysfunkcji śródbłonna naczyniowego w przebiegu niewydolności serca.

Praca napisana jest bardzo starannie i pomimo bardzo dużej liczby wyników łatwo zrozumieć ich znaczenie, prowadzące do prawidłowo wyciągniętych końcowych wniosków.

Z czystej ciekawości mam do Doktorantki pytanie o uniwersalność uzyskanych wyników na modelu myszy Tgαq\*44 w stosunku do innych rodzajów niewydolności serca np. w nadciśnieniu tętniczym.

Podsumowując, stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr farm. Tasnim Mohaissen spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (t.j. Dz. U. 2022, poz. 574 z późn. zm.). Otrzymane wyniki uzyskane w oparciu o zastosowanie nowoczesnych, precyzyjnych metod są nowatorskie, bardzo ciekawe, spójne, pozwalają na kompleksową ocenę zmian dotyczących badanej tematyki i co ważne mają potencjalne znaczenie terapeutyczne. Zostały one bardzo dobrze przedstawione oraz przedyskutowane, a także częściowo opublikowane w prestiżowym czasopiśmie o Impact Factor wynoszącym aż 14,3, przy czym pierwszym autorem tej publikacji jest Doktorantka. Dlatego też przedkładam Wysokiej Radzie Dyscypliny Nauki Medyczne Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum w Krakowie wniosek o dopuszczenie mgr farm. Tasnim Mohaissen do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych, a jednocześnie biorąc pod uwagę, że jak przedstawiłam powyżej, przedstawiona do mojej recenzji rozprawa doktorska ma bardzo wysoki poziom naukowy, wnoszę o jej **wyróżnienie**.

KIEROWNIK  
Zakładu Fizjologii i Patofizjologii  
Doświadczalnej  
  
prof. dr hab. Barbara Malinowska

Białystok, 19 czerwca 2023 r.

