



Prof. dr hab. n. farm. Ewa Chabielska
Zakład Biofarmacji
ul. Mickiewicza 2C,
15-222 Białystok
Tel. 85 7485607
e-mail: ewa.chabielska@umb.edu.pl

Recenzja rozprawy doktorskiej
mgr inż. Anny Marii Gduli

„Ocena wpływu agonistów receptorów adenozytowych i antagonistów receptorów P2Y
na funkcjonowanie komórek śródbłonka”

Promotor: Prof. dr hab. Maria Świątkowska
Promotor pomocniczy: dr n. med. Marta Stasiak

Praca wykonana w Zakładzie Cytobiologii i Proteomiki oraz w Zakładzie Zaburzeń Krzepnięcia
Krwii Katedry Nauk Biochemicznych Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

Współczesna terapia przeciwplatekowa, która jest strategicznym postępowaniem w prewencji i leczeniu chorób układu sercowo-naczyniowego nie jest zadawalająca z powodu niedostatecznej odpowiedzi płytek na działanie ich inhibitorów.

Zespół naukowców z Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, pod kierunkiem Pana Profesora Cezarego Watały, od kilku lat prowadzi badania nowej terapii przeciwplatekowej. Przedkliniczne badania zespołu wykazały nasilenie przez agonistów receptorów adenozytowych P1 (A_{2A} i A_{2B}) hamowania agregacji ludzkich płytek krwi i efektu przeciwzakrzepowego w modelu zwierzęcym wywołanego antagonistami receptora P2Y₁₂ (kangrelor, prasugrel).

Efekt terapeutyczny leków przeciwplatekowych może być modulowany przez wydzielnicze i funkcjonalne mechanizmy śródbłonka naczyniowego. Receptory A_{2A} , A_{2B} jak i P2Y₁₂, które ulegają także ekspresji w komórkach śródbłonka naczyniowego mogą być potencjalnie istotnie zaangażowane w przeciwplatekowe efekty ich agonistów i antagonistów. Jak ważna jest poprawa funkcji śródbłonka obrazuje współczesne leczenie kardiologiczne, często oparte na śródbłonkowych efektach takich leków jak inhibitory konwertazy angiotensyny II, statyny, czy niektóre β -blokerzy.

Na pełną akceptację i uznanie zasługuje włączenie się do badań nad nową terapią przeciwplatekową zespołu Pani Profesor Marii Świątkowskiej. Aktualność i znaczenie tematyki, a nade wszystko potrzeba, w pełni uzasadnia zakres rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Anny Marii Gduli. Doktorantka badała wybrane funkcje komórek śródbłonka naczyniowego poddanych działaniu agonistów receptorów adenozytowych (A_{2A} , A_{2B}) i antagonistów receptora nukleotydowego P2Y₁₂. Na uznanie zasługuje wielostronne podejście Doktorantki do tematu, wymagające umiejętności badania nie tylko funkcji śródbłonka naczyniowego, lecz także zagłębienia się w mechanizmy opisywanych zjawisk, w tym mechanizmy molekularne.

Licząca 295 stron rozprawa została napisana w układzie klasycznym. Jej właściwy tekst poprzedza przedstawiony na 4 stronach dorobek naukowy Doktorantki oraz informacja o źródle finansowania badań. Rozprawa jest podzielona na 9 rozdziałów. Piśmiennictwo składa się z 560 pozycji i zawiera w większości najnowsze publikacje, choć cytowane są również starsze prace z lat 70-tych XX wieku, co dowodzi dokładnej analizy piśmiennictwa i dobrego teoretycznego przygotowania Doktorantki do pracy eksperymentalnej i koncepcyjnej. Na uznanie zasługuje włączenie do tekstu

licznych autorskich rycin w części teoretycznej oraz metodycznej rozprawy. Praca doktorska jest napisana poprawną polszczyzną, choć niektóre sformułowania dalece wykraczają poza zwyczajowy tekst naukowy. Doktorantka użyła kilku błędnych sformułowań w odniesieniu do specjalistycznej terminologii medycznej. W moim odczuciu zbędne jest także używanie synonimów procedur i nazw medycznych.

Rozprawę rozpoczyna streszczenie w języku polskim i angielskim. Dalej, we wstępie pracy określonym jako „Wprowadzenie teoretyczne”, Autorka szczegółowo, w oparciu o 383 publikacje, opisuje najpierw zagadnienia dotyczące roli śródbłonna naczyń w procesach angiogenezy, hemostazy i procesie zapalnym oraz jego dysfunkcję w wybranych chorobach układu krążenia. W tej części wstępu interesujący fragment dotyczy znaczenia zapalenia śródbłonna w chorobie COVID-19 i związanych z tym powikłań zakrzepowych. Warto dodać, że powikłania zakrzepowe i kardiologiczne w przebiegu COVID-19 powinny determinować aktualne wybory terapeutyczne. Poza standardowym leczeniem antykoagulacyjnym, rozważa się włączenie do terapii leków przeciwplatek. Trwają aktualnie badania kliniczne terapii przeciwplatek we wspomnianej grupie pacjentów. Jakkolwiek trudno jest ocenić obecnie potencjał terapeutyczny nowej koncepcji jednoczesnej modulacji platek i śródbłonkowych receptorów nukleotydowych, jednak efekty przeciwzapalne i wpływ na kurczliwość naczyń badanych związków mogą mieć tu istotne znaczenie. W dalszej części wstępu Doktorantka charakteryzuje stosowane w pracy markery oceny czynności śródbłonna. Znaczną część wstępu poświęca opisowi receptorów nukleotydowych i ich znaczeniu w fizjologii i wybranych stanach patologicznych. Wstęp kończy charakterystyka agonistów i antagonistów receptorów nukleotydowych. Większość podrozdziałów części wprowadzającej Doktorantka opatrzyła autorskimi rycinami.

Cele badań zostały jasno sformułowane i zrealizowane w toku badań. Główny cel Doktorantka formułuje jako ocenę wpływu agonistów receptorów adenozykowych (A_{2A} i A_{2B}) oraz antagonistów receptorów nukleotydowych $P2Y_{12}$, stosowanych oddzielnie bądź łącznie, na funkcjonowanie komórek śródbłonna naczyń linii ludzkich komórek śródbłonna naczyń włosowatych skóry (HMEC-1). Cele szczegółowe obejmowały ocenę cytotoksyczności testowanych związków wobec HMEC-1, a następnie wpływ związków na proces angiogenezy, parametry związane z układem hemostazy i barierową funkcją śródbłonna oraz procesem zapalnym. Doktorantka wykorzystala 6 agonistów receptorów adenozykowych różniących się selektywnością tj.: UK 432097, MRE 0094, CGS 21680 i HE-NECA (selektywne wobec receptora A_{2A}), BAY 60-6582 (selektywny względem receptora A_{2B}) i NECA (nieselektywny agonista A_{1} , A_{2A} , A_3 , A_{2B}). Receptor $P2Y_{12}$ blokowano kangelorem oraz metabolitem prasugrelu.

Opis metodyki badań jest bardzo rzetelny, wsparty tabelami i często autorskimi rycinami. Dowodzi samodzielności wykonanej pracy eksperymentalnej i świadomego wyboru technik badawczych. Zwraca uwagę zastosowanie dużej ilości molekularnych, biochemicznych i czynnościowych technik badawczych.

Liczne wyniki badań są opisane bardzo szczegółowo i graficznie przedstawione na 35, w większości złożonych figurach, 8 fotografiach i w jednej tabeli. Wstępna ocena przeżywalności ludzkich komórek śródbłonna naczyń włosowatych skóry oraz cytotoksyczności badanych agonistów receptorów adenozykowych pozwoliła na wybór stężeń związków, które Doktorantka stosowała w dalszych eksperymentach. Zarówno w tym rozdziale, jak też w części dyskusyjnej, nie znalazłam odpowiedzi na pytanie: czy stosowane przez Doktorantkę stężenia agonistów i antagonistów odpowiadają stężeniom, które wykazywały korzystny efekt antyagregacyjny i czy są bezpieczne w odniesieniu do innych komórek krwi? Jestem także ciekawa, dlaczego w niektórych testach nie badano wszystkich 6 agonistów receptorów adenozykowych?

Do kluczowych obserwacji, w większości nowatorskich, należy zaliczyć: (1) agoniści receptorów adenozykowych z różną siłą, a także często w sposób przeciwstawny, wpływają na testowane parametry oceniające funkcjonowanie zdrowych komórek śródbłonna naczyń, (2) podwyższona ekspresja i uwalnianie VEGF, a także proangiogenne efekty będące wynikiem działania niektórych agonistów są zmniejszone w trakcie jednoczesnego blokowania receptora $P2Y_{12}$ w mechanizmie związanym z modulacją szlaku zależnego od kinazy tyrozynowej Src. Łączne stosowanie

związków powodowało spadek tempa migracji komórek HMEC-1 i spadek zdolności do formowania kapilar oraz wzrost ekspresji trombospondyny-1 TSP-1, (3) agoniści, a także ich połączenia z antagonistami, z różną siłą zmieniały funkcję barierową śródbłonna naczyniowego zwiększając bądź osłabiając przepuszczalność monowarstwy komórek HMEC-1, co mogło mieć związek ze zmianami ekspresji eNOS, (4) agoniści obniżali sekrecję ET-1, a dołączenie antagonistów nie zmieniło zwiększonego wydzielania ET-1, co może być efektem korzystnym w odniesieniu do hemostazy oraz stanu kurczliwości naczyń, (5) efekty przeciwwzpalne badanych agonistów i ich połączeń widoczne były tylko w stanie stymulacji prozapalnej. Uważam, że wyniki uzyskane w tej pracy będą stanowiły cenną podstawę do dalszych badań nad rolą badanych związków i ich połączeń w farmakologicznej modulacji hemostazy i funkcji naczyń krwionośnych. Wskazują też na celowość rozszerzenia badań w układach naśladujących stany patologiczne, zbliżając tym samym eksperymenty do warunków klinicznych.

W części dyskusyjnej analiza wyników jest wnikliwa i merytoryczna. Analizę wyników cechuje ostrożność interpretacji, wynikająca także z faktu, że badania prowadzono w układzie izolowanym. W przypadku uzyskania niejednoznacznych wyników, Doktorantka proponuje interesujące hipotezy, a dobra znajomość badanych zagadnień pozwala na ich logiczne uzasadnienie. Czując pewien niedosyt interpretacji uzyskanych wyników, chciałabym poznać opinię Doktorantki dotyczącą następującego zagadnienia: Które połączenie badanych związków może być typowane jako najkorzystniejsze w odniesieniu do funkcji komórek śródbłonna naczyniowego i czy jest ono również korzystne pod względem działania przeciwplateletowego?

Autorka nie przedstawiła klasycznych wniosków, lecz liczący blisko 4 strony rozdział pt. „Stwierdzenia i wnioski końcowe”, które są w rzeczywistości szczegółowym streszczeniem pracy. Uważam, że w świetle szerokiego zakresu badań i interesujących wyników, korzystne byłoby sformułowanie wniosków ogólnych, w tym jak już wspomniałam, dotyczących połączenia związków, które zdaniem Doktorantki jest najkorzystniejsze i powinno być szerzej badane. W tym też rozdziale na stronie 260, komentując swoje badania, Doktorantka pisze „Uważam, że proponowane podejście terapeutyczne niesie ze sobą dodatkowy pozytywny aspekt, mianowicie stanowi rozwiązanie problemu nadmiernej aktywacji i dysfunkcji komórek śródbłonna podczas procedur terapeutycznych” – proszę o sprecyzowanie o jakie procedury chodzi?

Ocena końcowa

Podsumowując moją recenzję stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr inż. Anny Marii Gduli stanowi rzetelnie przeprowadzone badanie naukowe, interesujące z uwagi na poruszaną problematykę i w dużej mierze nowatorskie wyniki. Widoczny jest ogrom pracy koncepcyjnej i eksperymentalnej oraz dobra znajomość zagadnień stanowiących tematyczny obszar rozprawy. Uwagi i pytania, które przedstawiłam, nie umniejszają wartości rozprawy, lecz są wyrazem mojego dużego zainteresowania tematem badań. Uważam, że praca wnosi cenny wkład do światowej wiedzy z zakresu farmakologii związków modulujących działanie receptorów nukleotydowych.

Stwierdzam, że praca spełnia wymogi rozprawy na stopień doktora nauk medycznych i kieruję do Rady Nauk Medycznych Uniwersytetu Medycznego w Łodzi wniosek o dopuszczenie Pani mgr inż. Anny Marii Gduli do dalszych etapów przewodu doktorskiego w dziedzinie nauki medycznej i nauki o zdrowiu, dyscyplinie - nauki medyczne.

Prof. dr hab. n. farm. Ewa Chabielska

8.02.2022 ✓