



**WYDZIAŁ BIOLOGII
I OCHRONY
ŚRODOWISKA**

Uniwersytet Łódzki

Łódź, dnia 1 lutego 2022 r.

Dr hab. Joanna Kołodziejczyk-Czepas, prof. UŁ
Katedra Biochemii Ogólnej, Uniwersytet Łódzki
ul. Pomorska 141/143, 90-236 Łódź
tel. 42 635 44 83

Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Anny Marii Gduli

„OCENA WPŁYWU AGONISTÓW RECEPTORÓW ADENOZYNOWYCH I ANTAGONISTÓW RECEPTORÓW P2Y NA FUNKCJONOWANIE KOMÓREK ŚRÓDBŁONKA”

**wykonanej Zakładzie Cytobiologii i Proteomiki oraz Zakładzie Zaburzeń Krzepnięcia Krwi
Katedry Nauk Biochemicznych Uniwersytetu Medycznego w Łodzi**

Złożone mechanizmy patofizjologii chorób układu krążenia obejmują utratę równowagi hemostatycznej wynikającą z zaburzeń funkcjonowania kluczowych elementów układu hemostazy: płytek krwi, osoczowych czynników krzepnięcia krwi, układu fibrynolitycznego oraz dysfunkcji śródbłonka. Wśród wymienionych składników decydujących o sprawności działania układu hemostazy, szczególną rolę odgrywa śródbłonek ściany naczyń krwionośnych. Jako regulator hemostazy wewnątrznaczyniowej, funkcji wazomotorycznych, ciśnienia krwi, przebudowy tkanek i procesów naprawczych, endotelium stanowi istotny element fizjologii nie tylko układu sercowo-naczyniowego, ale także całego organizmu. To wielokierunkowe działanie komórek endotelialnych pociąga za sobą również ważne konsekwencje patologiczne. Dysfunkcja śródbłonka stanowi nie tylko lokalne zaburzenie w obrębie struktury ściany naczynia, ale przekłada się na szereg innych patologii dotyczących funkcjonowania układu sercowo-naczyniowego.

Jak dotąd, zarówno liczne próby opracowania nowych, jak i udoskonalenia istniejących strategii terapeutycznych nie doprowadziły do satysfakcjonującej redukcji zapadalności na choroby układu krążenia i śmiertelności chorych na skutek powikłań zakrzepowo-zatorowych. Stąd też tematyka podjęta przez Autorkę dysertacji stanowi bardzo ważne i aktualne zagadnienie. Przedstawiona do recenzji rozprawa obejmuje prace badawcze *in vitro* koncentrujące się wokół możliwości modulowania odpowiedzi komórek śródbłonka przy udziale agonistów receptorów adenozynowych P1 i antagonistów receptorów nukleotydocowych P2Y₁₂, w podejściu dualnym - zakładającym zastosowanie obu tych mechanizmów.

Oceniana dysertacja stanowi obszerne, 295-stronicowe opracowanie w formie monografii. Całość pracy charakteryzuje się uporządkowaną, przejrzystą strukturą, typową dla prac zawierających część doświadczalną. Pracę podzielono na 9 głównych sekcji, obejmujących wprowadzenie teoretyczne (I), omówienie założeń i celów pracy (II), materiały i metody (III), wyniki (IV), dyskusję (V), stwierdzenia i wnioski końcowe (VI), wykaz skrótów używanych w tekście (VII), wykaz tabel i rycin (VIII) oraz piśmiennictwo (IX). Ponadto, praca zawiera streszczenia w języku polskim i angielskim, informacje o źródłach finansowania badań, a także wykaz dorobku naukowego i innych osiągnięć Autorki.

I. Wprowadzenie teoretyczne

Część teoretyczna dysertacji to wielowątkowe omówienie zagadnień związanych fizjologią endotelium. Obejmuje ono m.in. przedstawienie budowy śródbłonka naczyniowego, jego roli w różnorodnych procesach fizjologicznych, a także problemu dysfunkcji śródbłonka i jej konsekwencji patologicznych - w tym bardzo aktualnych kwestii zaburzeń w ciężkich powikłaniach w przebiegu COVID-19 (tj. podrozdział 1.3.4). W dalszych sekcjach *Wprowadzenia teoretycznego*, Doktorantka omówiła wybrane aspekty związane z oceną czynnościową śródbłonka, w tym markery angiogenezy, procesów zapalnych i funkcji hemostatycznych. Ze względu na tematykę pracy, na podkreślenie zasługuje fakt szczegółowego oraz dogłębnego omówienia przez Autorkę budowy, klasyfikacji i mechanizmów działania receptorów nukleotydowych, a także zamieszczenie charakterystyki chemicznej i biochemicznej badanych agonistów i antagonistów. Część teoretyczną wykonano z dużą starannością, a przygotowanie merytoryczne i zaangażowanie Doktorantki potwierdza nie tylko wysoki poziom naukowy tej sekcji pracy, cytowanie najnowszej literatury, ale także liczne autorskie ryciny wzbogacające tekst (w części teoretycznej jest ich 20; dodatkowo o rycinę wzbogacono także obie wersje językowe streszczenia).

Z obowiązku recenzenta muszę jednak zwrócić uwagę na pewne nieścisłości lub niedociągnięcia, które pojawiły się w tej części dysertacji. Stwierdzeniem, które wymaga korekty jest między innymi sformułowanie odnoszące się do nadtlenoazotynu: „*W wyniku reakcji anionów nadtlenukowych z cząsteczkami NO powstaje agresywny rodnik azotowy - nadtlenoazotyn (ONOO-), który nie tylko zmniejsza istniejący rezerwuar tlenu azotu, ale również blokuje jego syntezę poprzez obniżenie aktywności syntazy eNOS.*” (na stronie 40). Wspomniany przez Autorkę nadtlenoazotyn, jest reaktywną formą tlenu (i azotu), ale związek ten nie ma charakteru rodnikowego.

W tekście pracy Doktorantka stosuje także wymiennie określenie trombocyty i płytki krwi. W naukach biomedycznych istnieje pewne zamieszanie dotyczące nazewnictwa płytek krwi i używania terminu „trombocyty”, należy jednak zaznaczyć, że określenia te nie są synonimami. Płytki krwi to określenie ludzkich najmniejszych morfotycznych, bezjądrzastych komórek krwi uczestniczących w hemostazie i procesach związanych z odpowiedzią immunologiczną. Z kolei

„trombocyty” to określenie znacznie szersze, odnoszące się m.in. do pełniących analogiczne funkcje jądrzastych komórek niższych kręgowców.

W obrębie **Wprowadzenia teoretycznego** pojawiają się również niezbyt fortunne sformułowania lub skróty myślowe, na przykład:

- „W wyniku przemian z nieaktywnego substratu powstaje trombina, odpowiadająca za agregację płytek krwi oraz tworzenie nierozpuszczalnej sieci fibrynowej.” (strona 30 – nie jest jasne, o jakie przemiany i jaki substrat chodzi. Czy na przykład Autorka miała na myśli aktywację osoczowej kaskady białek krzepnięcia krwi, czy sam już etap działania kompleksu protrombinazy i proteolityczną aktywację protrombiny (proenzymu) do trombiny).
- „Wykazano, że PAI-1 oraz PAI-2 są zaangażowane w hamowanie czynności odpowiednio: t-PA i u-PA.” (strona 31 – przytoczone zdanie sugeruje, że każdy z wymienionych inhibitorów aktywatorów plazminogenu (PAI) odpowiada za hamowanie konkretnego aktywatora fibrynolizy, podczas gdy PAI-1 (główny fizjologiczny inhibitor aktywacji plazminogenu) jest zdolny do hamowania zarówno t-PA, jak i u-PA).
- „Podobnie jak w przypadku opisanego już zjawiska wazodylatacji, proces wazokonstrukcji zostaje zapoczątkowany zmianą śródbłonkowego naprężenia ścinającego.” (strona 34 – zapewne chodzi o proces wazokonstrykcji – skurcz naczyń).
- „Z kolei wzajemna interakcja pomiędzy trombocytami, a komórkami śródbłonka zapoczątkowuje proces fibrynolizy, której efektem jest wzrost stężenia D-dimerów we krwi [123, 128].” (strona 43) - stwierdzenie to ma charakter skrótu myślowego. Interakcje płytek krwi i komórek śródbłonka stanowią zaledwie jeden z elementów odpowiedzi hemostatycznej i uruchamiania kontroli powstającego skrzepu. Mechanizm aktywacji fibrynolizy w procesie hemostazy obejmuje wiele aspektów, tym interakcje białek krzepnięcia, składników dopełniacza, stymulację wydzielania tkankowego aktywatora fibrynolizy przez śródbłonek, czy kofaktorową rolę powstającego włóknika.
- Niezbyt jasne sformułowanie myśli w zdaniu dotyczącym charakterystyki czynnika VEGF „Po części występuje w stanie związanym na powierzchni komórek oraz w kompartmentach macierzy zewnątrzkomórkowej, a w niewielkiej ilości, również w formie rozpuszczonej.” (strona 45 – nie doprecyzowano, co to są „kompartymenty macierzy zewnątrzkomórkowej”).
- Na stronie 61 pojawiło się stwierdzenie „Endotelina-1 (ET-1) jest głównym przedstawicielem rodziny peptydów wykazujących silne właściwości wazokonstrykcyjne.” (zapewne chodzi o działanie wazokonstrykcyjne).
- Stwierdzenie na stronie 65 „Spośród cytokin zapalnych, zwiększoną przepuszczalność śródbłonka naczyniowego odnotowano dla histaminy i bradykininy.” (należy zauważyć, że bradykinina i histamina to hormony tkankowe, nie cytokiny).
- Na stronie 80 zamieszczono następujące stwierdzenie „Komórki DC prezentują antygeny limfocytom T, w ten sposób prowadząc do syntezy i uwolnienia interleukiny-10, interleukiny-1 β czy też interferonu gamma, będących kluczowymi cytokinami reakcji zapalnej”, z którego wynika, że interleukina 10 jest cytokiną prozapalną. Zdanie wymaga skorygowania, ponieważ IL-10 (cytokine

synthesis inhibitory factor, CSIF) jest cytokiną o działaniu przeciwzapalnym - jej uwalnianie ma na celu hamowanie wytwarzania cytokin prozapalnych.

- W rozdziale „4. Charakterystyka badanych agonistów i antagonistów receptorów nukleotydowych” brak wyjaśnienia skrótu IUPAC; podana gwiazdka odnosi się jedynie do wyjaśnienia, że jest to nomenklatura chemiczna. W rozdziale tym pojawia się również wielokrotnie niejasne określenie „dochodzenie kliniczne” – czy Autorka miała na myśli badania kliniczne?

II. ZAŁOŻENIA I CELE PRACY

Doktorantka jasno wyjaśniła główne założenia pracy, przedstawiła uzasadnienie podjęcia badań i podała sprecyzowany cel przewodni pracy, tj. ustalenie, w jaki sposób badana dwutorowa strategia przeciwzakrzepowa wpływa na kluczowe procesy zachodzące z udziałem komórek śródbłonka. Autorka wskazała również cztery prawidłowo sformułowane cele pomocnicze.

Przygotowanie tej części pracy nie budzi zastrzeżeń, z obowiązku recenzenta pragnę tylko zwrócić uwagę na potrzebę uściślenia następującego sformułowania: „...osób zakażonych wirusem COVID-19.”, które pojawiło się na stronie nr 100. Akronim COVID-19 określa jednostkę chorobową, natomiast wirus wywołujący chorobę określany jest skrótem Sars-CoV-2.

Rozdział III. Materiały i metody

Wyżej wspomniana sekcja została przygotowana w sposób bardzo przemyślany i uporządkowany. Bardzo dobrym rozwiązaniem jest wprowadzenie przez Autorkę licznych tabel umożliwiających syntetyczne i precyzyjne przedstawienie informacji dotyczących zastosowanej aparatury i odczynników, a także charakterystyki badanych agonistów i antagonistów. Wprawdzie Doktorantce nie udało się ustrzec przed pewnymi niedociągnięciami, ale dokładność i ogólny poziom przygotowania tej części pracy zasługują jak najbardziej na pozytywną ocenę.

Uwagi recenzenta do tej części dysertacji:

- W rozdziale III pojawiają się nieprawidłowości z zapisie stężeń stosowanych w pracach badawczych. Na stronie 102 Autorka podała nieprawidłowy zapis stężenia: 100 mM/l, które dosłownie oznacza 100 milimoli substancji na litr na litr. Użycie skrótu mM już samo oznacza stężenie molowe (mmol/l). Należy stosować zapis albo mM albo mmol/l. Analogiczny błąd pojawia się również w zapisach dotyczących stężeń mikromolowych (np. 100 μ M/l na stronie 103) i jest wielokrotnie powielany w dalszych częściach pracy, w tym w części dotyczącej opisu wyników. Jednocześnie należy zauważyć, że w przeważającej części przypadków Doktorantka posługuje się jednak prawidłowymi zapisami stężenia (μ M oraz mM).
- Pewne zamieszanie dotyczy także kwestii przedstawiania elementów graficznych w pracy. W części teoretycznej dysertacji grafika przedstawiana jest w formie rycin, numerowanych kolejno od 1 do 21. Natomiast w omawianym rozdziale pojawiają się zdjęcia, które są podpisywane jako „Fotografia”, a ich numeracja znowu rozpoczyna się od 1, podczas gdy numeracja rycin dalej kontynuowana jest w sposób ciągły. Ogólnie przyjęte podpisywanie rysunków, schematów i zdjęć

jako ryciny i zastosowanie ciągłości ich numeracji we wszystkich częściach dysertacji byłoby rozwiązaniem ułatwiającym odbiór pracy.

- W tabeli 11. *Warunki rozdziału elektroforetycznego SDS-PAGE* określenie „*running gel*” odpowiada polskiemu terminowi „żel rozdzielający”, a nie „żel rozbiegowy”, jak podaje Autorka.
- Na stronie 127, w rozdziale 7.1.1. Pomiar sekrecji czynnika wzrostu śródbłonna naczyniowego (VEGF) pojawia się niejasny zapis warunków wirowania: (800 x rcf, 5 minut). Czy chodzi o 800 x g? Jeśli chodziło o parametr *rcf* (względna siła odśrodkowa), należy również podać model wirówki i nr/typ rotora - celem ustalenia jego promienia), aby możliwe było odtworzenie warunków doświadczenia.
- W rozdziale 7.1.2. *Pomiar wydzielania trombospondyny-1 (TSP-1)* pojawiają się kolokwializmy branżowe: „...do eppendorfa”.

IV. WYNIKI

Część dysertacji poświęcona wynikom uzyskanym przez Autorkę potwierdza jej bardzo dobry warsztat metodyczny, umiejętność projektowania i optymalizowania układów doświadczalnych, modyfikacji i doboru warunków doświadczalnych oraz wnikliwej analizy uzyskanych danych. Pomimo wieloaspektowego charakteru prac badawczych, różnorodności analiz i dużej ilości danych, Doktorantka bardzo umiejętnie zaprezentowała uzyskane wyniki zarówno w formie opisowej i graficznej. Sposób omówienia oraz prezentacji wyników jest typowy dla rodzaju realizowanych badań i w przeważającej większości przejrzysty. Niektóre części tej sekcji wymagają jednak pewnego doprecyzowania lub korekty.

- Również w części wynikowej zapis prezentacji graficznej wyników jest niespójny. Do rycin i fotografii z poprzednich sekcji, Autorka wprowadza odrębne pojęcia „*Figura*” na określenie rycin z wykresami obrazującymi uzyskane wyniki. Zamiast ciągłości numeracji rycin, pojawia się więc seria numerowanych kolejno „*Figur*”.
- Podobnie, jak w części metodycznej pojawiają się błędne zapisy stężeń (m.in. na wykresach wchodzących w skład figury 1).
- Autorka stosuje w pracy określenia „stężenie” i „dawka” jako synonimy, podczas gdy znaczenie tych określeń nie jest tożsame.
- W opisie pod figurą 15 ilustrującą wyniki analiz techniką Western blotting zamieszczono następującą adnotację „*W celu uzyskania lepszej przejrzystości, niniejsza figura została poddana nieznacznej korekcji gamma.*” Proszę o doprecyzowanie stopnia modulowania obrazu i użytego oprogramowania.
- Podpisy osi na niektórych wykresach są niespójne językowo: np. na figurze 31 podpisy na osi X są w języku angielskim, na Y w języku polskim. Na figurze 33 podpisy osi są w języku angielskim, natomiast legenda została podana w języku polskim.

Dyskusja

W tej części pracy, Autorka podjęła bardzo udaną próbę skonfrontowania swoich wyników z danymi literaturowymi i wykazała nowatorstwo oraz znaczenie uzyskanych przez siebie wyników. Wyżej wymieniona sekcja została przygotowana w sposób poprawny. Zawiera krótki wstęp stanowiący zwięzłe posumowanie założeń pracy oraz szczegółowe omówienia i dyskusję danych uzyskanych w poszczególnych etapach prowadzenia badań. Całościowo, dyskusja to ponad 40 stron tekstu, który podzielono na 4 odrębne moduły, dotyczące kolejno (w skrócie) określenia cytotoksyczności badanych agonistów i antagonistów receptorów (1), oceny wpływu agonistów i antagonistów purynoceptorów na kluczowe czynniki zaangażowane w proces angiogenezy (2), określenia efektu modulacji receptorów nukleotydowych wybrane elementy hemostazy naczyniowej (3) oraz ocenę oddziaływania badanych agonistów receptorów adenozynowych P1 i antagonistów receptorów P2Y₁₂ na czynniki warunkujące przebieg procesu zapalnego (4). Dynamiczne, opisowo-dyskusyjne podejście do uzyskanych wyników oraz ich możliwego znaczenia dla terapii przeciwzakrzepowych potwierdza dojrzałość naukową Doktorantki.

VI. Stwierdzenia i wnioski końcowe

Rozdział ten obejmuje 3,5-stronicowe omówienie zawartości pracy, koncepcji badań oraz wyjaśnienie ich znaczenia. Część podsumowująca jest przydatnym skrótem opisu badań i ich znaczenia, a wysunięte wnioski znajdują odzwierciedlenie w wynikach uzyskanych z przeprowadzonych przez Doktorantkę badań.

Ocena pozostałych aspektów i sekcji pracy

Praca została przygotowana starannie pod względem edytorskim, choć Autorce również nie udało się ustrzec przed pewnymi potknięciami stylistycznymi i edytorskimi, które jednak nie wpływają na poziom pracy i ogólną pozytywną ocenę dysertacji przez recenzenta.

Streszczenia w języku polskim i angielskim odzwierciedlają zawartość pracy.

Wykaz piśmiennictwa obejmuje aż 560 pozycji, a jego dobór jest adekwatny do tematyki, której dotyczy dysertacja. Dobór literatury i umiejętne korzystanie z tych źródeł, zarówno w części wprowadzeniowej, jak i w dyskusji potwierdzają znajomość tematyki badawczej i najnowszej literatury przez Doktorantkę.

Wykaz skrótów używanych w tekście zawiera w większości prawidłowe wyjaśnienia, z nieznacznymi nieścisłościami – np. skrót ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) wyjaśniono nieco zbyt ogólnie, jako test immunoenzymatyczny, tymczasem jest to adsorpcyjny/płytkowy test immunoenzymatyczny. Samo określenie "test immunoenzymatyczny" może obejmować również inne metody oparte na zastosowaniu przeciwciał i enzymów.

Skrót *PAI* rozwinięto w języku angielskim jako *plasminogen activation inhibitors* i wyjaśniono jako inhibitor aktywacji plazminogenu. Prawidłowe rozwinięcie i wyjaśnienie to: *plasminogen activator inhibitor* – inhibitor aktywatorów plazminogenu.

Podsumowanie oceny pracy i wniosek końcowy

W przeciwdziałaniu powikłaniom zakrzepowym, większość obecnych podejść terapeutycznych i badawczych celuje w ograniczenie aktywności białek osoczowej kaskady krzepnięcia oraz płytek krwi, natomiast rola śródbłonna jako celu terapii stanowi inne spojrzenie i dostarcza nowych możliwości w opracowaniu skutecznych strategii leczniczych. Podjęcie przez Doktorantkę tematyki badawczej dotyczącej modulowania odpowiedzi komórek śródbłonna przy zastosowaniu dualnego podejścia do purynoceptorów (antagonizacji receptora P2Y₁₂ i agonizacji receptora adenozynowego P1) jako strategii przeciwwzakrzepowej oceniam jako bardzo istotne i w pełni zasadne.

Przedstawiona do recenzji praca autorstwa Pani mgr inż. Anny Gduli obejmuje nowatorskie podejście do udoskonalania terapii przeciwwzakrzepowych, a jej struktura oparta jest na przemyślanych założeniach badawczych, rzeczowej analizie wyników na etapie optymalizacji warunków badań oraz docelowych eksperymentów i stanowi oryginalne rozwiązanie problemu badawczego. Dysertacja dostarcza bardzo cennych informacji, nie tylko w aspekcie poznawczym – ale także pod kątem wartości aplikacyjnej wyników. Doktorantka wykazała się zarówno wiedzą, jak i samodzielnością w realizacji zaplanowanych zadań badawczych. Wskazane w recenzji uchybienia i kwestie wymagające doprecyzowania nie wpływają na ogólną, pozytywną ocenę pracy.

Dysertacja odpowiada wymogom stawianym rozprawom doktorskim, zawartym w art.13 Ustawy z dn. 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytułach naukowych oraz stopniach i tytułach w zakresie sztuki (Dz.U.nr 65, poz. 595 z późn.zm.). W związku z powyższym, wnioskuję o dopuszczenie Pani mgr inż. Anny Gduli do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Joanna Kołodziejczyk-Czepas

Joanna Kołodziejczyk - Czepas