Łódź, dnia 04.08.2023

dr hab. Michał Błażej Ponczek

Uniwersytet Łódzki
Wydział Biologii i Ochrony Środowiska UŁ
Katedra Biochemii Ogólnej

Ocena pracy doktorskiej **lek., mgr farm. Dominiki Katarzyny Jarmoc**
pt. **„Przeciwzakrzepowe i hemodynamiczne właściwości nowych donorów nitroksylu (HNO)"**

Cel, założenia, konstrukcja dysertacji i dorobek naukowy

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska, została zrealizowana w Zakładzie Chemii Fizycznej Wydziału Farmaceutycznego z Odziałem Medycyny Laboratoryjnej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku, pod opieką merytoryczną promotora dr hab. n. farm. Karola Franciszka Kramkowskiego. Tekst właściwy rozprawy podzielony został na pięć rozdziałów, nie licząc takich obecnych składowych pracy jak „Wykaz skrótów", „Wnioski", streszczenia, wykazy tabel i rycin oraz spis piśmiennictwa. Konstrukcja dysertacji jest zgodna z formą eksperymentalnych prac doktorskich.

Cel rozprawy doktorskiej lek., mgr farm. Dominiki Jarmoc został sformułowany jako „wykazanie właściwości przeciwzakrzepowych i hemodynamicznych nowych donorów HNO, będących pochodnymi kwasu Piloty'ego z wykorzystaniem różnych eksperymentalnych modeli zwierzęcych in vivo uzupełnionych badaniami ex vivo oraz ogólna charakterystyka mechanizmu działania tych związków". Rozdział zawierający założenia i cel pracy oraz cała część doświadczalna wraz z wynikami, dyskusją oraz wnioskami (32 strony), która po tym rozdziale następuje, jest poprzedzona wstępem (22 strony) podzielonym na cztery podrozdziały – „Hemostaza", „Układ krzepnięcia". „Negatywne skutki zaburzeń hemostazy" oraz „Nitroksyl - HNO". Praca nie zawiera informacji na temat upowszechniania

Wydział Biologii i Ochrony Środowiska UŁ
Katedra Biochemii Ogólnej
ul. Pomorska 141/143
90-236 Łódź, Polska
T: +48 42 635 44 83
F: +48 42 635 44 84
E: michal.ponczek@biol.uni.lodz.pl
W: www.biol.uni.lodz.pl

uzyskanych wyników w czasopismach naukowych. Autorka nie podaje w pracy informacji o innym swoim dorobku naukowym, jednakże na podstawie wyszukiwania internetowego można ustalić w oparciu o dane ze stron http://biblioteka.amb.edu.pl/ i https://biblioteka.umb.edu.pl/, stan na dzień 2 sierpnia 2023 roku, że jest współautorką przynajmniej czterech doniesień konferencyjnych w ramach sympozjum Polskiego Towarzystwa Kardiologicznego oraz trzech recenzowanych publikacji naukowych. Analizując dane baz *Web of Science Core Collection* oraz *Scopus* możliwe jest ustalenie, że jest współautorką odpowiednio 4 i 3 prac opublikowanych w czasopismach naukowych w latach 2016-2019, cytowanych łącznie 19 razy, *h-index* autorki 3, co stanowi dobry dorobek naukowy na tym etapie kariery.

Staranność przygotowania i merytoryczna ocena rozprawy doktorskiej

Rozprawa doktorska została przygotowana dość starannie pod względem językowym i nie dopatrzyłem się większych uchybień wymagających poprawy korektorskiej.

Podrozdziały wstępu w sposób merytoryczny przedstawiają stan wiedzy naukowej na temat hemostazy, płytek krwi. układu krzepnięcia, negatywnych skutków zaburzeń hemostazy oraz nitroksylu. Wyniki uzyskane przez zaplanowane i zrealizowane doświadczenia wraz ze sformułowanymi wnioskami, poszerzają wiedzę odnośnie właściwości przeciwzakrzepowych i hemodynamicznych nowych donorów HNO w wybranych modelach zwierzęcych.

Autorka pracy we wstępie na stronie 9 wprowadza czytelnika w choroby sercowo-naczyniowe i problemy z nimi związane, uwzględniając zaburzenia krzepnięcia krwi oraz układu naczyniowego. Podejmuje także kwestie związane ze stosowaniem aktualnie znanych leków przeciwpłytkowych i generujących NO oraz niedoskonałość tych leków, jak uszkodzenia błony śluzowej żołądka w przypadku kwasu acetylosalicylowego, bliżej niewymienione w pracy interakcje klopidogrelu, oporność na leki przeciwpłytkowe, a także wzrost tolerancji na egzogenne formy NO. Nie wgłębia się w inne strategie leczenia przeciwzakrzepowego, przeciwmiażdżycowego ani nadciśnieniowego.

Kolejny podrozdział wstępu to „Hemostaza", gdzie przedstawione są przede wszystkim płytki krwi w następujących podpunktach: „Płytki krwi, Budowa płytek krwi, Mechanizmy aktywacji płytek krwi, Populacje płytek krwi, Zmiana kształtu płytek, Adhezja i agregacja, Sekrecja".

„Układ krzepnięcia" to kolejny wyodrębniony podrozdział, choć jest to niewątpliwie ważna składowa hemostazy, która mogłaby się zawierać jako odpowiednio wydzielona część

Wydział Biologii i Ochrony Środowiska UŁ
Katedra Biochemii Ogólnej
ul. Pomorska 141/143
90-236 Łódź, Polska
T: +48 42 635 44 83
E: michal.ponczek@biol.uni.lodz.pl
W: www.biol.uni.lodz.pl

poprzedniego podrozdziału. Autorka przybliża w Tabeli 2 osoczowe czynniki krzepnięcia i opisuje ich znaczenie w podpunkcie „Kaskada krzepnięcia" wyodrębniając oraz przybliżając dwa klasyczne szlaki: wewnątrzpochodny i zewnątrzpochodny. Opis oraz rycina 3 dobrze przedstawiają wzajemne powiązania między czynnikami w obu szlakach, jednakże brakuje uwzględnienia dodatniego sprzężenia zwrotnego pomiędzy trombiną, a czynnikiem XI. Wiadomo bowiem już od dawna, że trombina generowana w szlaku zewnątrzpochodnym może aktywować czynnik XI, co zwrotnie prowadzi do zwiększonego generowania trombiny poprzez składowe układu wewnątrzpochodnego (czynnik XI i IX), ale bez udziału bezpośredniej aktywacji przez kontakt (nie jest do tego wymagana aktywacja czynnika XII). W zdaniu na stronie 22, wiersz 8 od dołu brakuje czasownika np. „tworzenia", "formowania" itp., a zdanie brzmi „Końcową i kluczową fazą kaskady krzepnięcia, a zarazem finalnym wynikiem współdziałania czynników krzepnięcia, płytek, szeregu agonistów i aktywatorów jest przestrzennej sieci fibryny, która zapewni stabilność powstającemu zakrzepowi". W kolejnym zdaniu jest nieprecyzyjne sformułowanie: „dzieje się tak dzięki zdolności trombiny do rozkładu białka fibrynogenu na mniejsze fibrynopeptydy, i jeszcze mniejsze monomery fibryny". Zdanie to sugeruje, że trombina trawi fibrynogen na fragmenty w postaci fibrynopeptydów, a w rzeczywistości enzym ten odszczepia jedynie N-końcowe krótkie fragmenty – fibrynopeptydy (odpowiednio A i B z łańcuchów Aα i Bβ fibrynogenu), a cały ogrom cząsteczki białka zostaje nietknięty, przekształcony w monomer fibryny, zatem twierdzenie „jeszcze mniejsze monomery fibryny" należy uznać za wprowadzające w błąd, ponieważ monomer fibryny jest jedynie nieco mniejszy od fibrynogenu o odpowiednio 4 stosunkowo krótkie fibrynopeptydy (2 A i 2 B), a dopiero takie monomery fibryny polimeryzują do fibryny (dzięki odsłonięciu N-końcowych „węzłów" kompatybilnych do obecnych na C-końcach kieszeni w łańcuchach γ i β).

Dalej opisywany jest kolejny podpunkt: „Układ fibrynolizy", gdzie autorka dość skrótowo przybliża znaczenie takich białek jak plazminogen, tkankowy aktywator plazminogenu oraz urokinazowy aktywator plazminogenu (urokinaza).

Kolejne podrozdziały to „Negatywne skutki hemostazy" oraz „Nitroksyl – HNO". Równanie reakcji przekształcenia dwóch cząsteczek HNO poprzez produkt przejściowy HONNOH do N_2O i wody nie zawiera indeksów dolnych przy oznaczeniach atomu azotu dla N_2O oraz wodoru w cząsteczce wody. Tam gdzie jest podawana sól Angeliego brakuje cytowania (Angeli A. Gazz Chim Ital 1896;26:17) albo szerszego przybliżenia postaci włoskiego chemika Angelo Angeli (1864-1931).

Rycina 6 „Schemat powstawania tlenku azotu przy udziale syntazy tlenku azotu" zawiera angielską nazwę „ Nitric oxide", a nie polską tlenek azotu, a dodatkowo ponieważ tlenek azotu

Wydział Biologii i Ochrony Środowiska UŁ
Katedra Biochemii Ogólnej
ul. Pomorska 141/143
90-236 Łódź, Polska
T: +48 42 635 44 83
E: michal.ponczek@biol.uni.lodz.pl
W: www.biol.uni.lodz.pl

jest wolnym rodnikiem powinno to być przy nim zaznaczone kropką przy odpowiednim atomie.

Niezależnie od wymienionych uwag wstęp (część teoretyczną) uważam za interesujący oraz istotny naukowo.

Część doświadczalna opisuje „Materiały i Metody" („Zwierzęta", „Spis odczynników", „Badane związki chemiczne", „Zakrzepica tętnicza stymulowana prądem u szczura", „Uszkodzenia Śródbłonka indukowane laserem lub $FeCl_3$ u myszy", „Pomiary hemodynamiczne", „Pomiary ex vivo; Morfologia, Dynamiczna generacja tromboksanu B2, Tromboelastometria, Oznaczenia w osoczu" i do tej części mam jedynie niewielkie zapytania natury metodycznej. Podrozdział „Pomiary ex vivo" (strona 38) zawiera opis pozyskiwania osocza bogato płytkowego poprzez 20 minutowe wirowanie w temperaturze 4°C, przy 3000 obrotów na minutę (RPM), nie podany został promień rotora lub wartość RCF (G), aby warunki były opisane ściśle powtarzalnie. Dalej napisane jest: „Osocze mrożono, by wykorzystać do dalszych oznaczeń". Mrożenie bogato płytkowego osocza może powodować lizę płytek krwi na skutek tworzenia kryształków lodu i zwiększania objętości powstającego lodu, jeśli nie zastosuje się krioprotektanta, zatem do jakich doświadczeń stosowano takie osocze zawierające zamrożone i rozmrożone osocze bogatopłytkowe?

Ostatni podrozdział tej części pracy to „Statystyczna analiza wyników". Jakimi przesłankami kierowano się aby przedstawić wyniki jako średnią ± SEM? Jakimi testami przeprowadzono sprawdzenie zgodności rozkładu z normalnym, aby zdecydować o wyborze testu nieparametrycznego (Manna-Whitneya) lub parametrycznego (t-Studenta, dla prób niezależnych, jak sądzę). W sytuacji braku zgodności rozkładu z normalnym i wyborze testu Manna-Whitneya właściwszym sposobem przedstawienia wyników byłaby mediana i rozstęp międzykwartylowy. Liczba przypadków (n) w większości oznaczeń oscylowała w granicach 4-10 (informacje o liczbie przypadków w danym eksperymencie zostały podane w opisie rycin z wynikami), zatem właściwszym sposobem przedstawienia zmienności w przypadku średniej arytmetycznej (gdy rozkład zgodny z normalnym) byłoby odchylenie standardowe a nie SEM. Jest to uwaga czysto metodyczna odnośnie statystyki, ponieważ na podstawie analizy zaprezentowanych w pracy wyników nie ma to praktycznego znaczenia dla ich istotności i wysuniętych wniosków odnośnie działania przeciwzakrzepowego nowych donorów HNO w badaniach na zwierzęcych modelach zakrzepicy, wskazując mechanizmy zależne od hamowania płytek krwi wraz z aktywacją fibrynolizy opisane szerzej w Dyskusji niniejszej rozprawy na koniec formułując 10 wniosków. Niewątpliwie część z nich jest kluczowych dla niniejszej rozprawy (1-5), jednakże niektóre z można być może scalić ze względu na rodzaj badanego związku (np. odpowiednio 2-CH3-4COOHPA lub 2-BrPA) w jeden lub kilka

Wydział Biologii i Ochrony Środowiska UŁ
Katedra Biochemii Ogólnej
ul. Pomorska 141/143
90-236 Łódź, Polska
T: +48 42 635 44 83
E: michal.ponczek@biol.uni.lodz.pl
W: www.biol.uni.lodz.pl

łącznych wniosków. Pozycje 6-10 są bardziej stwierdzeniami obserwacyjnymi, opiniami lub perspektywami dla dalszych badań z uwzględnieniem związków stosowanych w badaniu.

Wnioski końcowe

Podsumowując należy podkreślić różnorodność zastosowanych metod badawczych oraz istotne wyniki i wnioski z zaplanowanych i zrealizowanych eksperymentów.

Stwierdzam, że oceniania rozprawa doktorska spełnia wymagania zawarte w aktualnie obowiązujących regulacjach prawnych, które są stawiane kandydatom ubiegającym się o stopień naukowy doktora. Wnoszę do Senatu Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku o dopuszczenie lek., mgr farm. Dominiki Katarzyny Jarmoc do dalszych etapów przewodu doktorskiego w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu, dyscyplinie nauki medyczne.

Z wyrazami szacunku,

Michał Błażej Ponczek

Wydział Biologii i Ochrony Środowiska UŁ
Katedra Biochemii Ogólnej
ul. Pomorska 141/143
90-236 Łódź, Polska
T: +48 42 635 44 83
E: michal.ponczek@biol.uni.lodz.pl
W: www.biol.uni.lodz.pl