Ocena rozprawy doktorskiej
mgr farm. Dominiki Katarzyny Jarmoc
zatytułowanej ***„Przeciwzakrzepowe i hemodynamiczne właściwości nowych donorów nitroksylu (HNO)"***
wykonanej na Wydziale Farmaceutycznym z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej
Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku
pod kierunkiem promotora
dr hab. n. farm. Karola Franciszka Kramkowskiego

Uniwersytet Jagielloński

Prof. n. med.
Ewa Łucja Stępień
Kierownik Zakładu
e-mail: e.stepien@uj.edu.pl

Instytut Fizyki
im. M. Smoluchowskiego

ZFM
Zakład Fizyki Medycznej

tel. sekr. 12 664 46 40
tel. bezp. 12 664 47 62
ul. Łojasiewicza 11
30-348 Kraków

Większość zakrzepic przebiega bezobjawowo, a jednym z objawów żylnej choroby zakrzepowo-zatorowej jest zator tętnicy płucnej, który może być śmiertelny. Według różnych źródeł, powikłania zakrzepowo-zatorowe stanowią trzecią w Polsce a czwartą w krajach rozwiniętych przyczynę zgonu. Ważkość tego problemu nabrała na sile szczególnie w okresie pandemii koronawirusa, kiedy to okazało się że typowy obraz kliniczny pacjenta z koronawirusem to brak istotnych objawów klinicznych (u 80% pacjentów) lub objawy kliniczne łagodne, a u 20 % zakażonych dominują objawy ciężkiego śródmiąższowego zapalenia płuc o różnym stopniu nasilenia. Jedna ta grupa z łagodnych przebiegiem jest zdecydowanie bardziej narażona powikłania zakrzepowo-zatorowe. Badania przeprowadzone przez szwedzkich naukowców pod kierunkiem dr Anne-Marie Fors Connolly w roku 2021 wykazały, że infekcja koronawirusem wiąże się z 33-krotnie zwiększonym ryzykiem wystąpienia zatoru płucnego, natomiast ryzyko pojawienia się zakrzepicy żył głębokich rośnie pięciokrotnie. Co ważne, niebezpieczeństwo wystąpienia tych powikłań utrzymuje się jeszcze przez kilka miesięcy po przebytej infekcji.

Z tego powodu temat pracy doktorskiej pani **mgr Dominiki Jarmoc** jest istotny i niezmiernie ciekawy. Ciekawe i ważne dla zrozumienia mechanizmów zakrzepowych, dla wprowadzenia nowych metod farmakoterapii prewencyjnej i interwencyjnej są też badania, jakie doktorantka wykonała pod kierunkiem swojego promotora **dr hab. Karola Kramkowskiego**.

W swojej pracy doktorskiej **mgr Dominika Jarmoc** przeprowadziła badania na dwóch rodzajach donorów nitroksylu (HNO): krótko- i długodziałających. W pierwszej grupie wykorzystała sól Angeliego (AS, trioksodiazotan sodu) i donory HNO, będące pochodnymi kwasu Piloty'ego (2-bromo-N-hydroksybenzenosulfonamid (2-BrPA) podawany w zawiesinie lub w kompleksie z Captisolem, w celu wykazania efektu działania i uzyskania odpowiedzi, czy ten drugi jest odpowiednim kandydatem do dalszych badań. Drugą grupę stanowiły długodziałające pochodne kwasu Piloty'ego (2-CH3PA:Captisol i 2-CH3-4-COOHPA), z których wybrano kandydata odpowiedniego do podawania przewlekłego. Związki te kandydatka scharakteryzowała i opisała w tabeli, w rozdziale 3. Materiały i metody pracy doktorskiej (Tabela 4). W tym samym rozdziale p. **mgr Jarmoc** opisała

doświadczalne modele zwierzęce jakimi posługiwała się w swojej pracy doktorskiej:

- szczury Wistar *cmdb* z hodowli nie krewniaczej
- myszy C57BL66/*cmdb* (B6) oraz myszy C57BL/*6-Tg(CAG-EGFP)1Osb/1* (GFP)

Piszę o tym ponieważ opis i charakterystyka tego szczepu myszy jest bardzo lakoniczna, a po poszukiwaniach w Internecie znalazłam informację na stronie producenta *the Jackson Laboratory*, aby podawać nr ref. JAX stock #006567, a ekspresja EGFP jest powszechna we wszystkich tkankach z wyjątkiem erytrocytów i włosów. Tutaj oczekiwałabym wyjaśnienia ze strony doktorantki fizjologii i genetyki tego szczepu myszy.

Doktorantka w swojej pracy zastosowała dwa modele zakrzepicy:

- zakrzepica tętnicza indukowana (stymulowana, jak pisze doktorantka) prądem u szczurów w tętnicy szyjnej;
- uszkodzenie śródbłonka indukowane laserem lub $FeCl_3$ u myszy.

W opisie tego drugiego modelu, doktorantka skupiła się na technicznych aspektach, co jest bardzo ważne dla zrozumienia tego modelu, ale brakuje podkreślenia istotnego aspektu przeprowadzonych eksperymentów, że fizjologiczny mechanizm formowania zakrzepu w żyle kreskowej u myszy jest inny niż w modelu zakrzepicy tętniczej. Można się tego doczytać w tekście, lecz moim zdaniem to powinno być uwypuklone w tytule podrozdziału **3.5**. W modelu zakrzepicy żylnej nie doczytałam, czy i jak były szczurom podawane badane leki, co w modelu zakrzepicy żylnej było szczegółowo opisane.

Ten aspekt jasnego opisu metodologii pracy doktorskiej jest bardzo ważny, ponieważ w części zawierającej wyniki pracy (4.1 Wpływ donorów HNO na formowanie zakrzepu - zakrzepica tętnicza stymulowana prądem elektrycznym) znajduje się opis wyników uzyskanych u myszy (Ryc. 10), co jak sądzę jest tylko przejęzyczeniem.

Poza tym, jeśli chodzi o prezentację wyników, moją uwagę zwrócił sposób przedstawiania liczebności grup w przeprowadzonych eksperymentach. W niektórych liczebność jest podana precyzyjnie (Ryc. 14, n=7; Ryc. 18, n=5) a w niektórych już mniej precyzyjnie (Ryc. 11, n=4-5; Ryc. 13, n=4-7). Jest to w przypadku Ryc. 13, która przedstawia dynamikę agregacji płytek (Wpływ AS na kumulację płytek krwi po laserowym uszkodzeniu śródbłonka u myszy GFP) tylko w dwóch warunkach: grupa kontrolna i badana (sól Angeliego w stężeniu 60 mg/kg) swego rodzaju niedopatrzeniem.

Moje krytyczne uwagi do sposobu prezentacji wyników nie umniejszają wartości merytorycznej pracy i wagi naukowej odkryć jakich dokonała

Uniwersytet Jagielloński

Prof. n. med.
Ewa Łucja Stępień
Kierownik Zakładu
e-mail: e.stepien@uj.edu.pl

Instytut Fizyki
im. M. Smoluchowskiego

ZFM
Zakład Fizyki Medycznej

tel. sekr. 12 664 46 40
tel. bezp. 12 664 47 62
ul. Łojasiewicza 11
30-348 Kraków

doktorantka p. **mgr farm. Dominika Jarmoc** pod kierunkiem swego promotora **dr hab. n. farm. Karola Kramkowskiego.**

Doktorantka wykazała, że donory HNO: AS, 2-BrPA, 2-CH3-4-COOHPA, 2-CH3PA wykazują działanie przeciwzakrzepowe, poprzez swoje działanie przeciwpłytkowe i częściowo, profibrynolityczne. Co prawda brakuje w panelu badań laboratoryjnych metody pomiaru stopnia agregacji płytek, która w klinice jest złotym standardem dla oceny agregacji, ale jest ten efekt wykazany pośrednio przy użyciu metody tromboelastometrii (gdzie badana jest dynamika tworzenia skrzepliny/skrzepu w krwi pełnej, indukowana aktywatorem płytek jakim jest kolagen) i przez pomiar stężenia tromboksanu. Do badań naukowych stosowane są też inne niż agregometria płytkowa metody oceny aktywacji płytek. Chętnie podczas obrony pracy doktorskiej wysłuchałabym opinii doktorantki na temat tych metod, ich dostępności, zalet i ograniczeń.

Drugim ważnym odkryciem doktorantki jest pokazanie, że 2-CH3-4-COOHPA działa on przeciwzakrzepowo w dawkach niewywołujących zmian ciśnienia krwi, co może nadać mu w przyszłości istotne wartości kliniczne. Działanie to wykazano przede wszystkim w metodach *in vivo*, również przy wykorzystaniu nowoczesnych metod obrazowania przyżyciowego (model myszy transgenicznych), jak też w metodach *ex vivo* (pomiary zakrzepu, dynamika formowania skrzepliny). 2-CH3-4-COOHPA nie wpływa natomiast na aktywność śródbłonka i zwiększenie uwalniania t-PA, czynnika biorącego udział w fibrynolizie. Chciałoby się tu powiedzieć *niestety*, bo ten mechanizm działania leków przeciwzakrzepowych jest niezmiernie pożądany, szczególnie w przypadku leczenia powikłań.

Dlatego też zgadzam się z wnioskiem doktorantki podsumowującym jej pracę, że należy kontynuować badania nad tymi donorami HNO, w modelu stosowania przewlekłego, a w szczególności ocenić ich dokładny mechanizm działania.

Podsumowując, wymienione w pracy cel badawczy, którym było 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, zostały zrealizowane.

Przechodząc na koniec do edytorskiej strony pracy, znalazłam w niej neologizmy, które utrudniają zrozumienie treści. Na przykład zwrot *„może ulec deprotonacji"* można zapisać inaczej *„oddaje protony"*. Pomylona została numeracja cytowanej literatury, co zauważyłam na pozycji 108 (powinno być 109), i konsekwentnie te błąd utrudniał doczytanie odpowiednich odniesień do literatury.

Pracę doktorską oceniam pozytywnie, jest dobrze udokumentowana

Uniwersytet Jagielloński

Prof. n. med.
Ewa Łucja Stępień
Kierownik Zakładu
e-mail: e.stepien@uj.edu.pl

Instytut Fizyki
im. M. Smoluchowskiego

Zakład Fizyki Medycznej

tel. sekr. 12 664 46 40
tel. bezp. 12 664 47 62
ul. Łojasiewicza 11
30-348 Kraków

I poparta wynikami badań naukowych, z wykorzystaniem modeli zwierzęcych. Doceniam ogrom pracy włożonej przez doktorantkę do przeprowadzenia badań i opracowania wyników.

Rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule naukowym w zakresie sztuki (t.j. Dz. U. z 2017 r., poz. 1789).

Wnioskuję zatem do Senatu Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku o nadanie stopnia doktora w reprezentowanej dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne dla **mgr farm. Dominiki Jarmoc**, zgodnie z obowiązującymi przepisami ustawy.

Uniwersytet Jagielloński

Prof. n. med.
Ewa Łucja Stępień
Kierownik Zakładu
e-mail: e.stepien@uj.edu.pl

Instytut Fizyki
im. M. Smoluchowskiego

Zakład Fizyki Medycznej

tel. sekr. 12 664 46 40
tel. bezp. 12 664 47 62
ul. Łojasiewicza 11
30-348 Kraków