GDAŃSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY

WYDZIAŁ FARMACEUTYCZNY Z ODDZIAŁEM MEDYCYNY LABORATORYJNEJ
Zakład Medycznej Diagnostyki Laboratoryjnej
80-211 Gdańsk, ul. Dębinki 7
tel. 58 349 27 91, tel/fax 58 349 27 92
Kierownik: dr hab. med. *Leszek Kalinowski* prof. nadzw.
e-mail: lekal@gumed.edu.pl

30 lipca 2016 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Emilii Sokołowskiej
pt. „Famakologiczne badania zmodyfikowanych kationowo polimerów dekstranowych przywracających prawidłową krzepliwość krwi po podaniu heparyny niefrakcjonowanej szczurom i myszom”

Badania nad nowymi substancjami odwracającymi przeciwkrzepliwe działanie heparyny jest bardzo aktualnym zagadnieniem w farmkologii doświadczalnej i klinicznej. Wynika to z faktu, że – pomimo pojawienia się na rynku farmaceutycznym nowych pozajelitowych leków hamujących krzepnięcie krwi – heparyna niefrakcjonowana nadal jest stosowana w leczeniu zakrzepicy żylnej i zatorowości płucnej, we wczesnym leczeniu niestabilnej dławicy piersiowej i świeżego zawału serca, u chorych poddanych operacji serca w krążeniu pozaustrojowym, operacji naczyniowej lub angioplastyce tętnic wieńcowych, u chorych z wszczepionymi stentami w tętnicach wieńcowych, u wybranych chorych z rozsianym krzepnięciem śródnaczyniowym i u chorych dializowanych. Biorąc pod uwagę, że liczba interwencji kardiochirurgicznych znacznie wzrosła w ostatnich latach na świecie, w tym także w Polsce, możliwość szybkiego i bezpiecznego odwrócenia działania heparyny w przypadku pojawienia się zagrażającego życiu krwawienia jeszcze bardziej zyskała na znaczeniu.

Do nedawna jedynym antidotum na działania heparyny było stosowanie znanej od wielu lat protaminy, co obarczone jest występowaniem dobrze opisanych reakcji niepożądanych po zostosowaniu tej substancji. Stąd istnieje duża potrzeba znalezienia skutecznego i bezpiecznego substytutu protaminy. Problem jest tym dotkliwszy do rozwiązania, że protamina jest nieskuteczna w stosunku do nowszych środków przeciwkrzepliwych, takich jak heparyna drobnocząsteczkowa lub fondaparynuks, co bardzo ogranicza stosowanie ich w czasie zabiegów kardiochirurgicznych z wykorzystaniem urządzeń wymagających obniżenia krzepliwości krwi. Przedstawiona do recenzji praca doktorska magister Emilli Sokołowskiej dobrze wpisuje się w próby rozwiązania tego pilnego problemu. Dotyczy zbadania właściwości farmakologicznych zmodyfikowanych kationowo polimerów dekstranowych pozyskanych dzięki współpracy z chemikami z Uniwersytetu

WYDZIAŁ FARMACEUTYCZNY Z ODDZIAŁEM MEDYCYNY LABORATORYJNEJ
Zakład Medycznej Diagnostyki Laboratoryjnej
80-211 Gdańsk, ul. Dębinki 7
tel. 58 349 27 91, tel/fax 58 349 27 92
Kierownik: dr hab. med. *Leszek Kalinowski* prof. nadzw.
e-mail: lekal@gumed.edu.pl

Jagiellońskiego w Krakowie. Określając dokładniej: w pracy doktorskiej opisano wyniki badań nad polimerem dekstranowym o masie 40 kDa z podstawionymi kationowymi grupami chlorku glicydylotrimetyloamoniowego (GTMAC) z częstością 0,65 GTMAC na cząsteczkę glukozy, któremu nadano nazwę Dex40-GTMAC3. Praca została wykonana pod opieką dr hab. Andrzeja Mogielnickiego z Zakładu Farmakodynamiki Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku, którego laboratorium posiada duże doświadczenie w prowadzeniu badań nad farmakologicznymi aspektami modyfikacji krzepliwości krwi.

Dorobek badawczy mgr Emilli Sokołowskiej przedstawiony w pracy dokotorskiej stanowią trzy publikacje: dwie z nich opublikowano w bardzo dobrych recenzowanych czasopismach o zasięgu międzynarodowym z zakresu farmakologii (*Eur J Pharmacol.* w 2012 r., IF=2,592 i *Front Pharmacol.* w 2016 r., IF=3,802), trzecią zaś w czasopismie krajowym (*Biul Wydz Farm WUM* w 2016 r., punktacja MNiSW=5). Doktorantka jest pierwszym autorem w dwóch z trzech wymienionych publikacji, co szczególnie podkreśla jej wkład w prowadzone badania. Całkowity IF prezentowanych prac wynosi 6,394, całkowita punktacja MNiSW wynosi 65.

Praca Doktorska mgr Sylwii Sokołowskiej została przedstawiona w postaci przewodnika, w którym można wyróżnić trzy główne części. W pierwszej jego części (Rozdziały 1 i 2) Doktorantka krótko przedstawia założenia teoretyczne i podstawy hipotezy badawczej do prowadzonych badań. Rozdział ten jest równoważny wstępowi teoretycznemu klasycznej pracy doktorskiej. Cel pracy, czyli zbadanie właściwości farmakologicznych zmodyfikowanych kationowo polimerów dekstrynowych Dex40-GTMAC3 został opisany jasno i precyzyjnie na jednej stronie na końcu pierwszej części przewodnika.

Część druga przewodnika składa się z wymienionych powyżej dwóch oryginalnych publikacji w czasopismach famakologicznych o obiegu międzynarodowym w języku angielskim (Rozdział 3 i 4) i publikacji przeglądowej napisanej po polsku (rozdział 5). Publikacja przeglądowa jest znakomitym uzupełnieniem do „Wprowadzenia" z Rozdziału 1 pracy doktorskiej w zakresie zagadnień teoretycznych - szczególnie do cytowania literatury związanej z tematem pracy doktorskiej. Doktorantka cytuje dużo tekstów źródłowych oryginalnych badań naukowych, tym samym unikając cytowania prac przeglądowych, co odbieram bardzo pozytywnie, gdyż jest dowodem na dogłębną analizę realizowanej tematyki badawczej. Moja uwaga dotyczy tutaj braku schematów czy rysunków obrazujących kaskadę krzepnięcia krwi z uwzględnieniem miejsc oddziaływania zarówno heparyny

WYDZIAŁ FARMACEUTYCZNY Z ODDZIAŁEM MEDYCYNY LABORATORYJNEJ
Zakład Medycznej Diagnostyki Laboratoryjnej
80-211 Gdańsk, ul. Dębinki 7
tel. 58 349 27 91, tel/fax 58 349 27 92
Kierownik: dr hab. med. *Leszek Kalinowski* prof. nadzw.
e-mail: lekal@gumed.edu.pl

niefrakcjonowanej jak również protaminy i innych – omawianych przez Doktorantkę – nowych środków hamujących krwawienie wywałane użyciem pozajelitowych leków przeciwkrzepliwych. Podobny schemat mógłby być dodatkowo zamieszczony z uwzględnieniem działania heparyny drobnocząsteczkowej i fondaparynuksu w artykule poglądowym (rozdział 5). Znacznie ułatwiłoby to analizę treści tego rozdziału.

Część trzecia przewodnika w rozdziałach „Dyskusja" (Rozdział 6) i „Wnioski" (Rozdział 7) uzupełnione o „Streszczenie" (Rozdział 8) razem z oryginalnymi pracami naukowymi zawierają wnikliwą analizę osiągnięć badawczych stanowiących potwierdzenie hipotezy badawczej. Prowadzona dyskusja i opis badań oceniam wysoko pod względem merytorycznym, a uzyskane wyniki za ważne dla dziedziny. Pytaniem (nie będącym rodzajem krytycznej uwagi recenzenta) rodzącym się jedynie z czystej ciekawości poznania dalszych planów badawczych, nie uwzględnionych w rozprawie doktorskiej jest, czy Doktorantka wraz z osobami współpracującymi rozważa możliwość modyfikacji cząsteczki Dex40-GTMAC3 tak, aby zmienić czas półtrwania dla dogodniejszego monitorowania hamowania krwawienia w przyszłości u ludzi? Naturalnym kolejnym pytaniem jest też, czy Doktorantka i Jej współpracownicy zamierzają zbadać efektywność Dex40-GTMAC3 w stosunku do nowszych pozajelitowych środków przeciwkrzepliwych – innych niż heparyna niefrakcjonowana?

Omawiając rozprawę doktorską należy podkreślić, że praktycznie wszystkie wyniki zostały już opublikowane w bardzo dobrych czasopismach, a tym samym poddane już wcześniej dokładnej analizie przez edytorów i recenzentów czasopism będących ekspertami w dziedzinie. Udział Doktorantki w prowadzonych badaniach był dominujący w wielu ważnych aspektach. Pomimo, że udział współautorów został jasno opisany w kluczowej pracy oryginalnej w *Front Pharmacol.* w podrozdziale „Authors contributions", wskazane byłoby, aby podobne zestawienie było przedstawione np. na końcu prac dla pozostałych dwóch publikacji włączonych do pracy doktorskiej.

W odniesieniu do użytych w pracy metod eksperymentalnych zauważyć należy, że Doktorantka w czasie wszystkich lat studiów doktoranckich opanowała bardzo szeroki wachlarz metod z zakresu szeroko pojętej analityki medycznej z uwzględnieniem umiejętności prowadzenia badań na zwierzętach (szczurach i myszach) w zakresie doświadczalnych modeli zakrzepicy naczyń krwionośnych.

Za najważniejsze odkrycia naukowe pracy doktorskiej magister Emilii Sokołowskiej uważam:

WYDZIAŁ FARMACEUTYCZNY Z ODDZIAŁEM MEDYCYNY LABORATORYJNEJ
Zakład Medycznej Diagnostyki Laboratoryjnej
80-211 Gdańsk, ul. Dębinki 7
tel. 58 349 27 91, tel/fax 58 349 27 92
Kierownik: dr hab. med. *Leszek Kalinowski* prof. nadzw.
e-mail: lekal@gumed.edu.pl

- Wykazanie, że Dex40-GTMAC3 całkowicie hamował działanie przeciwkrzepliwe heparyny niefrakcjonowanej w modelach doświadczalnych zakrzepicy tętniczej indukowanej prądem elektrycznym i zakrzepicy żylnej indukowanej chlorkiem żelaza (III) u myszy. Badany polimer skutecznie przywracał wydłużony po heparynie czas częściowej tromboplastyny po aktywacji (aPTT) do wartości kontrolnych.

- Udowodnienie, że Dex40-GTMAC3 ma korzystniejszy profil bezpieczeństwa niż protamina w obserwacji zarówno krótkoterminowej (po 1 h od podania u myszy) jak i długoterminowej (do 28 dni od podania u szczurów). Badany polimer był szybko elimonowany z ustroju, głównie z moczem i nie ulegał długotrwałej kumulacji tkankowej (czas półtrwania wynosił 12 minut dla eliminacji z osocza szczurów). Dex40-GTMAC3 nie zmieniał badanych paametrów biochemicznych i morfologicznych krwi, nie wywoływał też trwałych uszkodzeń narządowych.

Wyniki prac zawartych w rozprawie doktorskiej pozwalają przypuszczać, że Dex40-GTMAC3 jest kadydatem, aby w przyszłości zastąpić w praktyce klinicznej stosowaną od wielu lat protaminę, gdyż cechuje się wysoką skutecznością w przywracaniu prawidłowej krzepliwości krwi po podaniu heparyny niefrakcjonowanej przy niskiej toksyczności.

Przedstawiony do oceny przez magister Emilię Sokołowską przewodnik jest napisany poprawną polszczyzną. Doktorantka nie uniknęła drobnych błędów językowych czy typograficznych, niemniej nie mają one negatywnego wpływu na wartość merytoryczną wyników.

Podsumowując, przedstawiona rozprawa doktorska magister Emilii Sokołowskiej pod tytułem „Famakologiczne badania zmodyfikowanych kationowo polimerów dekstranowych przywracających prawidłową krzepliwość krwi po podaniu heparyny niefrakcjonowanej szczurom i myszom” ma oryginalny i nowatorski charakter, a zawarte w niej wyniki badań mają zdecydowanie cechy nowości naukowej. Doktorantka w bardzo trafny sposób wybrała metody badawcze do swoich eksperymentów, a otrzymane przez nią wyniki zostały opublikowane w bardzo dobrych czasopismach naukowych. Zamieszczone tutaj uwagi i zastrzeżenia nie mają wpływu na moją bardzo wysoką ocenę pracy. Po całkowitej ocenie przedstawionej pracy z całą pewnością stwierdzam, że spełnia wszystkie zwyczajowe i ustawowe wymagania stawiane pracom doktorskim. Podkreślając wysoki poziom merytoryczny pracy, dobry dorobek naukowy i duży wpływ wyników na rozwój dyscypliny

GDAŃSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY

WYDZIAŁ FARMACEUTYCZNY Z ODDZIAŁEM MEDYCYNY LABORATORYJNEJ
Zakład Medycznej Diagnostyki Laboratoryjnej
80-211 Gdańsk, ul. Dębinki 7
tel. 58 349 27 91, tel/fax 58 349 27 92
Kierownik: dr hab. med. *Leszek Kalinowski* prof. nadzw.
e-mail: lekal@gumed.edu.pl

wnoszę o wyróżnienie pracy odpowiednią nagrodą. Wnoszę więc do wysokiej Rady Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie jej Autorki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Leszek Kalinowski