UNIWERSYTET MEDYCZNY W ŁODZI

Łódź, dnia 30 sierpnia 2023

Szanowny Pan
Prof. dr hab. Wojciech Miltyk
Dziekan Kolegium Nauk Farmaceutycznych
Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku

Szanowny Panie Dziekanie,

W załączeniu przesyłam recenzję rozprawy doktorskiej recenzję rozprawy doktorskiej mgr Marty Iwanickiej pt. **„Nowe spojrzenie na przeciwpłytkowe mechanizmy działania donorów tlenku węgla"** zgodnie z uchwałą Senatu Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku z dnia 29 czerwca 2023.

Z wyrazami szacunku

PROFESOR UCZELNI
Zakład Biofarmacji, Katedra Biofarmacji
Uniwersytet Medyczny w Łodzi
Magdalena Jasińska-Stroschein
dr hab. n. farm. Magdalena Jasińska-Stroschein

UNIWERSYTET MEDYCZNY W ŁODZI

Łódź, dnia 30 sierpnia 2023

dr hab. n. farm. Magdalena Jasińska-Stroschein
Zakład Biofarmacji, Katedra Biofarmacji
Wydział Farmaceutyczny
Uniwersytet Medyczny w Łodzi

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Marty Iwanickiej pt. „**Nowe spojrzenie na przeciwpłytkowe mechanizmy działania donorów tlenku węgla**"

Przedstawiona do recenzji praca wykonana pod kierunkiem Pana dr hab. Karola Franciszka Kramkowskiego w Zakładzie Chemii Fizycznej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku dotyczy zbadania mechanizmów farmakologicznego działania jednego z donorów tlenku węgla (CO): CORM-A1, na aktywność płytek krwi. Przesłankę do prowadzonych badań stanowiły wcześniejsze doniesienia potwierdzające, że tlenek węgla, w odpowiednio dobranych dawkach, może działać przeciwpłytkowo i/lub przeciwzakrzepowo. Tlenek węgla – niskocząsteczkowy, gazowy mediator odznacza się wielokierunkową aktywnością. Obok innych gazoprzekaźników takich jak tlenek azotu ($NO^{\cdot}$) i siarkowodór (H_2S), odgrywa on istotną rolę w regulacji procesów życiowych, uczestnicząc w transdukcji sygnału w komórkach. W warunkach *in vivo* tlenek węgla jest wytwarzany przez oksygenazę hemową i reguluje ekspresję genów, przeżycie komórek oraz apoptozę. Wiele doniesień naukowych potwierdza udział tlenku węgla oraz oksygenazy hemowej w zintegrowanym systemie ochrony przed stresem komórkowym. Dokładniejsze poznanie funkcji tej cząsteczki dało początek dalszym poszukiwaniom potencjalnych korzyści związanych z jej zastosowaniem w chorobach układu nerwowego, immunologicznego, transplantologii, a także w chorobach układu sercowo-naczyniowego. Poza obserwacjami eksperymentalnymi *in vitro/in vivo*, prowadzone są także badania kliniczne z wykorzystaniem egzogennego tlenku węgla w szeregu modelach chorobowych (tętniczego nadciśnienia płucnego – PAH, przewlekłej obturacyjnej choroby płuc – COPD, zespołu ostrej niewydolności oddechowej – ARDS). Na początku lat 2000. grupa naukowców, pracujących pod kierunkiem Prof. Roberto Motterliniego odkryła i zsyntetyzowała związki – karbonylowane jony metali uwalniające CO (ang., Carbon Monoxide Releasing Molecules, CORMs): CORM-1, CORM-2, CORM-3, czy CORM-A1. Zdefiniowanie potencjalnych właściwości naczyniorozszerzających, cytoprotekcyjnych, przeciwzapalnych, czy przeciwpłytkowych ww. donorów CO wytyczyło tym samym nowe cele dla badań podstawowych, ukierunkowanych na poznanie mechanizmów działania i określenie możliwości ich dalszego wykorzystania w badaniach klinicznych.

Poszukiwanie nowych substancji o aktywności przeciwpłytkowej dla zastosowania w profilaktyce i leczeniu chorób układu sercowo-naczyniowego stanowi istotny problem kliniczny.

W ostatnich latach dokonał się istotny postęp w leczeniu przewkrzepliwym i przeciwpłytkowym, a także w kardiologii interwencyjnej. Zabiegi angioplastyki wieńcowej nakładają jednak konieczność długotrwałego stosowania terapii przeciwpłytkowej w różnych schematach. U części chorych może być ono nieskuteczne, co skutkuje wystąpieniem zakrzepicy w stencie oraz ostrego incydentu wieńcowego. Z kolei silniejsze zahamowanie czynności płytek przez leki kolejnych generacji koreluje ze zwiększoną częstością występowania powikłań krwotocznych. To wszystko wpisuje się w dane demograficzne wskazujące na choroby układu krążenia, w tym ostre i przewlekłe zespoły wieńcowe, jako główną od lat przyczynę zgonów w Polsce. Wybór tematyki pracy uważam tym samym za ważny i celowy zarówno w punktu widzenia badawczego jak i praktyki klinicznej. Potwierdza go także brak doniesień ukazujących kompleksowo działanie przeciwpłytkowe jednego z rozpuszczalnych donorów tlenku węgla: związku CORM-A1.

Dokonując oceny formalnej rozprawy należy stwierdzić, że licząca 120 stron dysertacja posiada układ typowy, na który składają się kolejno: Wstęp, Cel pracy, Metody, Wyniki, Dyskusja, Wnioski, Spis tabel i rycin, Bibliografia oraz streszczenia w języku polskim i angielskim. Właściwą część pracy poprzedza strona tytułowa, szczegółowy spis treści oraz wykaz skrótów, wraz z polskim tłumaczeniem, zestawiony w porządku alfabetycznym. Całość pracy uzupełnia znacząca ilość rycin (57) i tabel (11).

We wstępie do rozprawy Doktorantka opisała procesy hemostazy, przywołała powszechnie znany kaskadowy model krzepnięcia krwi z dwoma szlakami: zewnątrzpochodnym i wewnątrzpochodnym, jak i obecnie funkcjonujący komórkowy model krzepnięcia. Dalej, przypomniała rolę płytek krwi w procesach hemostazy, a w kolejnym podrozdziale opisała właściwości tlenku węgla i innych gazoprzekaźników. Podsumowując dowody na potencjalne właściwości ochronne egzogennego tlenku węgla w stosunku do serca i naczyń krwionośnych, Doktorantka krótko scharakteryzowała rodzinę donorów CO, w tym CORM-A1 – będący przedmiotem badań niniejszej rozprawy doktorskiej. Kolejny podrozdział Pani Marta Iwanicka poświęciła bardzo szeroko ukazaniu aktualnej sytuacji demograficznej w Polsce, ze szczególnym uwzględnieniem zgonów z przyczyn sercowo-naczyniowych. Lektura obszernego, bo liczącego ponad 50 stron, Wstępu do rozprawy pozwala postawić kolejne pytania o aktualne kierunki badań nad egzogennym CO czy CORMs, prowadzone w układach *in vitro*, na różnych modelach zwierzęcych, czy modelach chorobowych w planowanych/aktualnie realizowanych próbach klinicznych. Interesujące byłoby także przybliżenie potencjalnego znaczenia układu NO/CO. Z perspektywy farmakologa, ciekawym dopełnieniem tej części rozprawy byłaby choć krótka charakterystyka mechanizmów działania, czy podsumowanie miejsca w aktualnych wytycznych dla obecnie stosowanych leków przeciwpłytkowych – w aspekcie opisanych przez Doktorantkę struktur i komórek biorących udział w hemostazie (np. COX-1, GP IIb/IIIa, $P2Y_{12}$). Z drugiej strony czytelnik rozprawy może szczegółowo zaznajomić się z danymi w zakresie demografii. Doktorantka przytacza je szeroko, co ma uzasadnić celowość podjętych badań

w aspekcie wysokich wskaźników zgonów na choroby sercowo-naczyniowe, które mogą przebiegać z nadreaktywnością płytek krwi. Powyższe uwagi nie umniejszają faktu, że Pani Marta Iwanicka dobrze orientuje się w zakresie podjętych zagadnień i zna aktualne piśmiennictwo, o czym świadczy odniesienie się do 90 prac innych badaczy. Pozycje literaturowe – w większości anglojęzyczne prace naukowe są właściwie dobrane i umiejętnie cytowane w rozprawie.

W kolejnym rozdziale Doktorantka przedstawiła ogólny cel podjętych eksperymentów. W uzasadnieniu, przypomniała, że endogenny tlenek węgla uczestniczy w procesach katalitycznej degradacji hemu w obecności oksydazy hemowej i może działać przeciwpłytkowo normalizując proces zakrzepicy. Zwróciła też uwagę na możliwe implikacje kliniczne zaplanowanych badań – związane z zakwalifikowaniem donorów CO do dalszych prób przedklinicznych i klinicznych jako leków – kandydatów do stosowania w chorobach przebiegających z nadmierną krzepliwością krwi zależną od płytek. Wydaje się, że czytelność rozprawy podniosłoby szersze przedstawienie celów badawczych (np. cel główny oraz cele szczegółowe).

Na potrzeby szczegółowej oceny mechanizmów przeciwpłytkowego działania CORM-A1, Doktorantka zaplanowała szeroki panel metod *in vitro*. Materiał badawczy stanowiła krew żylna pobierana od zdrowych ochotników, celem uzyskania osocza bogatopłytkowego oraz ubogiego w płytki. Badanie uzyskało zgodę lokalnej Komisję Etyki ds. Badań Naukowych na Ludziach. Metodykę badań przedstawiono na 6 stronach dysertacji. Zaplanowane eksperymenty obejmowały szereg pomiarów, w tym pomiary funkcjonalne płytek krwi. W szczegółowym ujęciu, Doktorantka przeprowadziła oznaczenia agregacji płytek po zastosowaniu adenozynomonofosforanu (ADP), adrenaliny, A23187, kwasu arachidonowego, kolagenu, czy peptydu aktywującego receptor dla trombiny (TRAP). Wykonała pomiary sekrecji adenozynotrifosforanu (ATP), sygnału wapniowego po zastosowaniu trombiny, ekspresji P-selektyny i fosfatydyloseryny. Dokonała oceny wytwarzania mikropęcherzyków płytkowych, dynamicznej generacji tromboksanu B2, wytwarzania mleczanu i retrakcji skrzepu pełnej krwi. Przeprowadziła analizę kinetyki formowania skrzepu fibrynowo-płytkowego we krwi pełnej. Do tak zaplanowanych oznaczeń Pani mgr Iwanicka wykorzystała szeroki panel narzędzi badawczych. Należy w tym miejscu w pełni podkreślić i docenić wysiłek Doktorantki przy prowadzeniu poszczególnych eksperymentów z zakresu hemostazy. Na potrzeby swoich badań opanowała, a nieraz modyfikowała, szereg technik analizy instrumentalnej jak spektrofluorymetria, cytometria przepływowa, metody immunoenzymatyczne, wykazała się też umiejętnością stosowania specjalistycznej aparatury jak agregometr oraz tromboelastometr. W dalszej części poświęconej metodyce pracy, Doktorantka krótko scharakteryzowała testy statystyczne wybrane do ilościowej analizy otrzymanych wyników. Tylko z obowiązku recenzenta dodam, że z opisu analizy statystycznej nie wynika, czy poza normalnością rozkładu, weryfikowano także inne założenia wymagane do analizy uzyskanych wyników testem parametrycznym (ANOVA).

Wyniki badań zostały przedstawione dokładnie i przejrzyście, w formie opisowej i graficznej – na ponad dwudziestu rycinach. W Dyskusji Doktorantka podjęła próbę rzeczowego omówienia otrzymanych rezultatów i wyjaśnienia mechanizmów obserwowanych zjawisk, konfrontując je z osiągnięciami innych badaczy. Wynika z niej, że Doktorantce udało się zrealizować postawiony cel badawczy. Wykazała, że wpływ CO na płytki krwi jest złożony, i zależy zarówno od hamowania energetyki beztlenowej (hamowanie produkcji mleczanu) jak i mitochondrialnej (hamowanie oksydazy cytochromu C i rozprzęganie łańcucha oddechowego) płytek. Poza hamowaniem procesów oddychania tlenowego i beztlenowego, wpływ CORM-A1 na kinetykę narastania skrzepu zależał też od modulacji receptorów GP IIb/IIIa i obniżenia stężenia PAI-1. Pani Magister potwierdziła wpływ CORM-A1 na hamowanie agregacji płytek i sekrecji ATP, zmniejszenie prezentowania P-selektyny i fosfatydyloseryny na powierzchni płytki krwi – i w konsekwencji możliwego zmniejszenia aktywności prokoaguluacyjnej płytek, czy uwalniania z powierzchni mikropęcherzyków płytkowych. Ta ostatnia obserwacja wydaje się mieć istotne znaczenie w kontekście udziału mikropęcherzyków płytkowych w procesach proliferacji, krzepnięcia czy zapalenia. Kolejne wnioski dotyczyły hamowania sygnału wapniowego – w powiązaniu z fosfolipazą C oraz hamowania wytwarzania tromboksanu B2 – zależnie od COX-1. To ostatnie miałoby potwierdzić hamujący wpływ CORM-A1 na kaskadę kwasu arachidonowego. Następnie Doktorantka wykazała, że badany donor CO może upośledzać proces retrakcji (obkurczenia) skrzepu. Z drugiej strony retrakcja skrzepu wydaje się mieć istotne znaczenie w jego stabilizacji, zmniejszając ryzyko oderwania skrzepu, a w następstwie krwawienia, czy embolizacji naczynia. Cennym uzupełnieniem Dyskusji byłoby zatem odniesienie się do potencjalnych skutków zbadanego wpływu CORM-A1 na ten element hemostazy.

Podobnie, wydaje się, że dla porządku, ta część rozprawy powinna zawierać uzasadnienie wyboru związków (adrenalina, kolagen, adenozynomonofosforan, i inne) do pomiarów agregacji płytek czy sekrecji ATP, a także wyjaśnienie z czego wynikają zastosowane stężenia CORM-A1 (250, 500 i 1000 μM) – w kontekście oszacowanych wartości IC50 dla wybranych aktywatorów (Rycina 31).

Z innych, pomniejszych uwag należy wskazać:

- niejednorodne formatowanie piśmiennictwa (np. stosowanie zamiennie skrótów czasopism i pełnych tytułów)
- pewne nieścisłości w przygotowanym wykazie skrótów (np. powtórzenia skrótów: DMSO, t-PA (tPA); dwukrotne wyjaśnienie skrótu EDRF – z innym rozwinięciem: „*czynnik rozkurczowy pochodzenia śródbłonkowego*" lub „*śródbłonkowy czynnik rozluźniający*", z czego to pierwsze wydaje się być częściej stosowane; błędne rozwinięcie skrótu PMP: „*Platelet-derived microvesicles*" zamiast „*Platelet-derived microparticles*", brak uwzględnienia w wykazie skrótów *PLC, PRP* i inne)

- pewne uchybienia w formatowaniu tabel (np. w tabelach 7 i 9 – prezentacja danych liczbowych dotyczących chorób układu krążenia ogółem)
- brak wskazania literatury źródłowej w przypadku niektórych rycin, np. prezentującej budowę morfologiczną płytek krwi (Rycina 4).
- niejednorodne formatowanie rycin prezentujących badania własne; np. polskie i angielskie nazwy związków (np. *collagen* lub *kolagen*), różne jednostki stężeń w jakich stosowano CORM-A1 (np. *250 μM* lub *0,25 mM*), różne nazewnictwo grupy kontrolnej (*control, K, KONTROLA).*

Całość pracy napisana jest zrozumiałym i poprawnym językiem. Nie udało się jednak uniknąć litrówek, pewnych niezręczności stylistycznych czy niedokończonych zdań (np. *„I tak, w celu oceny stopnia zahamowania aktywacji płytek krwi po różnych aktywatorach w obecności donoru tlenku węgla.", str. 117).*

Pomimo wskazanych uwag całość pracy oceniam pozytywnie. Tematyka badawcza podjęta przez mgr Iwanicką jest ciekawa i wpisuje się w rozwój nauk farmaceutycznych. Otrzymane wyniki opisują w kompleksowy sposób wpływ związku CORM-A1 na aktywność prokoagulacyjną płytek krwi, stąd recenzowana praca stanowi oryginalne osiągnięcie Autorki. Poszerza ono wiedzę na temat mechanizmów działania tlenku węgla. Stanowi podstawę do badań nad oceną właściwości farmakologicznych jego donorów, w tym CORM-A1, a w dalszym etapie – do prób klinicznych z udziałem kandydatów-leków do stosowania w chorobach przebiegających z nadmierną aktywnością płytek krwi.

Podsumowując praca autorstwa Pani mgr Marty Iwanickiej pt. *„Nowe spojrzenie na przeciwpłytkowe mechanizmy działania donorów tlenku węgla"*, odpowiada warunkom formalnym i merytorycznym stawianym rozprawom doktorskim. Wnoszę tym samym do Rady Dyscypliny Nauk Farmaceutycznych Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku o dopuszczenie Pani mgr Marty Iwanickiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Magdalena Janusz-Boscher