

OCENA

rozprawy doktorskiej mgr Małgorzaty Karbowskiej pt. "Wpływ siarczanu indoksyli na proces krzepnięcia i fibrynolizy w zwierzęcym modelu zakrzepicy" wykonanej pod kierunkiem prof. dr hab. Dariusza Pawlaka z Zakładu Farmakodynamiki Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku.

Richard Bright już w 1836 r. po raz pierwszy postulował, że niewydolność nerek predysponuje do wystąpienia chorób sercowo-naczyniowych. Potwierdzają to liczne badania epidemiologiczne, w których w porównaniu z ogólną populacją, pacjenci z przewlekłą chorobą nerek charakteryzują się częstszym występowaniem i cięższym przebiegiem powikłań sercowo-naczyniowych. Przewlekłą niewydolność nerek *per se* uważa się za ekwiwalent choroby wieńcowej, w rzeczywistości osoby z wczesnym stadium niewydolności nerek są bardziej narażone na zgon z powodu chorób układu krążenia, niż w wyniku postępującej niewydolności nerek. Występowanie u chorych z przewlekłą niewydolnością nerek wielu klasycznych i nowych czynników ryzyka predysponuje tę grupę pacjentów do przedwczesnej śmiertelności sercowo-naczyniowej. Pomimo niezaprzeczalnego związku przewlekłej niewydolności nerek ze zwiększonym ryzykiem powikłań sercowo-naczyniowych istnieje wiele kontrowersji dotyczących patogenezy, profilaktyki, diagnostyki oraz leczenia chorób układu krążenia w tej grupie chorych, co wynika faktu, że wiele ugruntowanych metod diagnostycznych i strategii leczenia choroby niedokrwiennej serca nie było szczegółowo badanych u pacjentów z przewlekłą niewydolnością nerek. Co więcej, w wielu protokołach badań klinicznych rozpoznanie zaburzenia czynności nerek stanowi kryterium wyłączenia. Dlatego też bardzo cenne są badania dotyczące patofizjologii powikłań sercowo-naczyniowych, które nie tylko mają wartość poznawczą, ale mogą również przyczynić się do opracowania nowych strategii profilaktycznych, diagnostyki i leczenia. W ten nurt doskonale wpisuje się cykl prac stanowiący rozprawę doktorską opracowaną przez mgr farm. Małgorzatę Karbowską, poświęconych ocenie wpływu siarczanu indoksyli na proces krzepnięcia i fibrynolizy.

Na rozprawę doktorską mgr Małgorzaty Karbowskiej składają się trzy artykuły opublikowane w renomowanych czasopismach: dwie prace oryginalne - 1) Karbowska M, Kaminski TW, Marcinczyk N, Misztal T, Rusak T, Smyk L, Pawlak D. The Uremic Toxin Indoxyl Sulfate Accelerates Thrombotic Response after Vascular Injury in Animal Models. *Toxins* (Basel). 2017; 9: 229-244 (IF 3,273) oraz Karbowska M, Kaminski TW, Znorko B, Domaniewski T, Misztal T, Rusak T, Pryczynicz A, Guzinska-Ustymowicz K, Pawlak K, Pawlak D. Indoxyl Sulfate Promotes Arterial Thrombosis in Rat Model via Increased Levels of Complex

TF/VII, PAI-1, Platelet Activation as Well as Decreased Contents of SIRT1 and SIRT3. *Front Physiol.* 2018; 9: 1623 (IF 3,394) oraz jedna praca przeglądowa – Karbowska M, Kamiński T, Pawlak D. *Methods Of Reducing The Level Of Indoxyl Sulfate - One Of The Most Potent Protein-Bound Uremic Toxins.* *Toxin Reviews* 2016; 35: 171-179 (IF 0,789). We wszystkich pracach Doktorantka jest pierwszym autorem, jej udział w powstaniu poszczególnych prac wynosi odpowiednio: 50%, 60% oraz 85%, co zostało potwierdzone przez pozostałych współautorów poszczególnych prac. Ponadto przedłożona do oceny praca zawiera wprowadzenie, cel pracy, artykuły składające się na pracę doktorską, wnioski jak również streszczenia w języku polskim i angielskim. Ponadto w przesłanych materiałach znajdują się: życiorys oraz opis dorobku i doświadczenia naukowego Doktorantki. Zapoznanie z pracą ułatwiłoby przytoczenie w pełnej formie piśmiennictwa cytowanego we wprowadzeniu i dyskusji.

We wprowadzeniu Doktorantka przedstawiła dane epidemiologiczne dotyczące przewlekłej niewydolności nerek i towarzyszących jej powikłań sercowo-naczyniowych. Następnie przedstawiła zagadnienia związane z zaburzeniami hemostazy naczyniowej, płytkowej i osoczowej zdefiniowane u chorych z przewlekłą chorobą nerek. Zagadnienia dotyczące udziału siarczanu indoksyłu w patofizjologii przewlekłej niewydolności nerek przedstawiła Doktorantka w pracy poglądowej opublikowanej w *Toxin Reviews* (2016). W tym artykule Doktorantka, oprócz przedstawienia molekularnych mechanizmów działania siarczanu indoksyłu i patofizjologicznych następstw, dokonała przeglądu metod pozwalających zmniejszyć stężenie tej toksyny mocznicowej, tj. dializoterapii, stosowania związków ograniczających wiązanie z albuminą i transport błonowy, jak również adsorbentów, a także modyfikacji dietetycznych i składu bakterii jelitowych. Na podstawie danych przedstawionych w powyższych opracowaniach można stwierdzić, że siarczan indoksyłu jest czynnikiem ryzyka powikłań serowo-naczyniowych, jednakże mechanizm jego oddziaływania z układem krzepnięcia nie jest wyjaśniony i wymaga dalszych badań, co w pełni uzasadnia zakres badań stanowiących podstawę pracy doktorskiej opracowanej przez mgr Urszulę Karbowskiej.

W oparciu o przesłanki zawarte we wstępie i pracy poglądowej Doktorantka sformułowała następujące cele pracy doktorskiej: 1) analiza udziału siarczanu indoksyłu w modulowaniu parametrów krzepnięcia i fibrynolizy; 2) ocena dynamiki zmian zakrzepowych indukowanych siarczanem indoksyłu (podanie jednorazowe oraz wielokrotne) w zwierzęcym modelu doświadczalnym.

Dla zrealizowania postawionych celów Doktorantka przeprowadziła badania na szczurach Wistar Crl:WI (cmdb) i myszach szczepu C57B1/6J, które poddano narażeniu ostremu (jednorazowa dawka dożylna) oraz długotrwałemu (podanie doustne przez 4 tygodnie) na siarczan indoksyłu. Dla wykazania prozakrzepowego działania siarczanu indoksyłu Doktorantka wykorzystała następujące metody: pomiaru stężenia siarczanu

indoksyłu metodą HPLC (z detekcją fluorescencyjną), indukcji zakrzepicy tętniczej prądem elektrycznym lub wiązką promieniowania elektromagnetycznego (laser argonowy), analizy tromboelastometrycznej aparatem ROTEM, ilościowego określenia stężenia czynników hemostatycznych (PF4, vWF, FV, FXa, TF, kompleks TF/VII, TAFI, PAI-I, PAP, d-dimery) metodą ELISA, pomiaru APTT, TT, PT, stężenia fibrynogenu i ATIII koagulometrem oraz zestawem Bio-Ksel plasma kits, obrazowania indukcji i dynamiki narastania zakrzepu przy wykorzystaniu mikroskopii konfokalnej z przyżyciową wizualizacją fluorescencyjną, pomiaru zawartości SIRT1 i SIRT3 w homogenatach aorty metodą ELISA, histologicznej oceny zakrzepów (H&S), oceny agregacji płytek krwi indukowaną kolagenem (agregometr), pomiaru agregacji PRP (agregometr), określenia oporności osmotycznej erytrocytów (wg. metody Huntera) ponadto standardowymi metodami oznaczano parametry morfologii krwi i biochemiczne krwi (osocze) i moczu. Należy stwierdzić, że sposób zaplanowania badań oraz ich realizacja świadczą o bardzo dobrym merytorycznym przygotowaniu Doktorantki. Wynikają one również z długotrwałej pracy i doświadczenia w obszarze prowadzonego badania promotora prof. Dariusza Pawlaka, który jest uznanym autorytetem w dziedzinie.

Po przeprowadzeniu szeregu dobrze zaprojektowanych doświadczeń Doktorantka wykazała, m. in. zwiększoną kumulację płytek krwi w obszarze laserowego uszkodzenia śródbłonna po jednorazowym narażeniu na siarczan indoksyłu, wzrost liczby krążących płytek krwi oraz ich aktywacji pod wpływem długotrwałego narażenia na siarczan indoksyłu, wzrost stabilności skrzepu po ostrym jak i przewlekłym podawaniu siarczanu indoksyłu, skrócenie czasu potrzebnego do tworzenia stabilnego skrzepu, wzrost stężenia fibrynogenu, wzrost stężenia kompleksu czynnika tkankowego z czynnikiem VIIa, zmniejszenie zawartości sirtuiny 1 i 3 w ścianie aorty pod wpływem długotrwałego narażenia na siarczan indoksyłu, zwiększoną zawartość płytek krwi i fibryny w zakrzepach u zwierząt otrzymujących siarczan indoksyłu, zmniejszenie stężenia kompleksów plazmina-antyplazmina i wzrost stężenia PAI- 1 pod wpływem przewlekłego narażenia na siarczan indoksyłu.

Na podstawie przeprowadzonych badań Autorka przedstawiła pięć wniosków: 1. Siarczan indoksyłu zaburza równowagę pomiędzy procesami krzepnięcia/fibrynolizy powodując wzrost potencjału prozakrzepowego; 2. Siarczan indoksyłu nasila hemostazę pierwotną prowadząc do powstania czopu trombocytarnego na drodze zwiększenia liczby i aktywacji płytek; 3. Siarczan indoksyłu aktywuje hemostazę wtórną prowadząc między innymi do wzrostu stężenia kompleksów inicjujących proces krzepnięcia – kompleksów czynnika tkankowego z czynnikiem VIIa i wzrostu stężenia PAI-1; 4. W warunkach *in vitro* siarczan indoksydu nasila kinetykę tworzenia skrzepu zwiększając jego stabilność oraz skracając czas potrzebny do jego wytworzenia; 5. Siarczan indoksyłu może być jednym z kluczowych czynników odpowiedzialnych za incydenty zakrzepowo-zatorowe w przebiegu przewlekłej choroby nerek. Sformułowane przez Doktorantkę wnioski

dobrze oddają uzyskane wyniki, wynikają bezpośrednio z analizy wyników uzyskanych w czasie realizacji badań. Należy jednakże zwrócić uwagę, że wniosek 5 nie wynika bezpośrednio z przeprowadzonych badań.

W dyskusji Autorka odniosła wyniki własne do obserwacji poczynionych przez innych autorów (przytaczając najnowsze dane literaturowe). Dyskusja świadczy o doskonałym merytorycznym przygotowaniu Doktorantki, która pomimo opublikowania wyników w renomowanych czasopismach, zachowała pewną dozę krytycyzmu w stosunku do własnych obserwacji. Na uwagę zasługuje próba wyjaśnienia obserwowanych zmian układu krzepnięcia/hemostazy w oparciu o dostępne informacje dotyczące mechanizmów molekularnych mogących regulować badane procesy.

Reasumując należy stwierdzić, że cel pracy został w pełni zrealizowany, a uzyskane wyniki są oryginalnym osiągnięciem Autorki, która dobrze opanowała niełatwy warsztat badawczy i wykazała dobre merytoryczne przygotowanie. Uważam, że praca stanowi znaczący dorobek z elementami nowości naukowych i w pełni odpowiada wymaganiom stawianym pracom doktorskim. Dlatego też zwracam się do Rady Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej w Uniwersytecie Medycznego w Białymstoku o dopuszczenie mgr Małgorzaty Karbowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie, ze względu na bardzo wysoki poziom merytoryczny pracy, docenionej również przez grono międzynarodowych ekspertów, wnioskuję o wyróżnienie pracy *summa cum laude*. Wyniki badań stanowiących podstawę pracy doktorskiej opublikowano w renomowanych czasopismach o zasięgu międzynarodowym: *Frontiers in Physiology* (IF=3,394), *Toxins* (IF 3,273) oraz *Toxin Reviews* (IF 0,789).



Prof. dr hab. n. med. Marek Drożdżik