



ul. Świącickiego 4
60-781 Poznań

tel.: 61 854 66 20
fax: 61 854 66 21
e-mail: vkrajka@ump.edu.pl

Poznań, 09.11.2023r.

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Gabrieli Chyły-Danił

z tytułu

„Farmakologiczna modyfikacja stężenia czynnika wzrostu śródbłonna naczyń A (VEGF-A) w przebiegu cukrzycy typu 1; potencjalna strategia terapeutyczna ograniczająca rozwój nefropatii cukrzycowej”

przygotowana w związku z pismem prof. dr hab. Wiesława Sawickiego, Przewodniczącego Rady Nauk Farmaceutycznych Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, zgodnie z uchwałą nr 59/2023 Rady Nauk Farmaceutycznych Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego z dnia 19.09.2023 r.

Przedłożona do recenzji rozprawa na stopień doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu, została wykonana w Zakładzie Chemii Klinicznej Katedry Analityki Klinicznej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego. Kierownikiem jednostki jak i przedmiotowej rozprawy jest prof. dr hab. Maciej Jankowski.

Rozprawa ma formę wydruku na 61 stronach, z czego pierwsze 24 strony obejmują streszczenie w języku polskim i angielskim, informacje o finansowaniu badań, otrzymanej zgodzie Lokalnej Komisji Etycznej oraz wstęp. Z kolei strony od 25-61 obejmują cel pracy, metody oraz omówienie wyników, dalej wnioski i piśmiennictwo. W mojej opinii krótka sylwetka doktorantki byłaby cennym uzupełnieniem w niniejszej rozprawie szczególnie zamieszczona na początku rozprawy.

Pozostała część rozprawy zawiera kopie publikacji wchodzące w skład rozprawy doktorskiej bez zamieszczenia oświadczeń współautorów.

Tematyka poruszana w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej wpisuje się w zagadnienia związane z cukrzycą, a szczególnie problemu nefropatii cukrzycowej będącej jej najczęstszym powikłaniem. Dane Międzynarodowej Federacji Diabetologicznej z roku 2021 szacują, że cukrzyca pojawia się z częstością wynoszącą 10.5% z tendencją do wzrostu. W konsekwencji cukrzyca, nefropatia cukrzycowa rozwija się u około 30% chorych z cukrzycą typu 1 oraz u około 50% chorych z cukrzycą typu 2. Te dane potwierdzają ważność i aktualność podjętego tematu badawczego.

Celem rozprawy było określenie mechanizmu działania suraminy, będącej heksasulfonowaną pochodną naftylomocznika na nerki w modelach eksperymentalnych obejmujących krótko- i długoterminową cukrzycę. Cel ten starano się osiągnąć m.in. poprzez określenie poziomu stężenia czynnika wzrostu śródbłonka naczyń A (VEGF-A), który reguluje proliferację, różnicowanie i przeżycie komórek śródbłonka kłębuszków nerkowych. Ocena tego parametru jak i wielu pozostałych może przyczynić się do poznania mechanizmów prowadzących do nefropatii cukrzycowej oraz wskazać potencjalne możliwości terapeutyczne tego problemu.

Część rozprawy obejmująca rozdział „Materiały i metody” charakteryzuje grupy badawcze i pozyskany materiał biologiczny oraz opisy metod oznaczeń wytypowanych parametrów i analizę statystyczną. Model badawczy stanowiły dwie grupy zwierząt stada Wistar pochodzące z Akademickiej Zwierzętarńi Doświadczalnej – Centrum Badawczo-Usługowego w Gdańsku. Każda grupa licząca po 28 zwierząt, została docelowo podzielona na cztery podgrupy, a czas trwania eksperymentów dla grupy krótkoterminowej wynosił 3 tygodnie a długoterminowej 12 tygodni. Celem wywołania cukrzycy w obu modelach zastosowano streptozotocynę w dawce 60mg/kg m.c. osiągając skuteczność indukcji hiperglikemii na poziomie około 88%. W tym miejscu nasuwa się pytanie o zastosowaną dawkę streptozotocyny 60mg/kg m.c. (rozprawa doktorska str. 33) czy 65mg/kg m.c. (publikacja *Pharmacological Reports*), lub z czego wynika ta rozbieżność?

Materiałem badawczym był mocz z dobowej zbiórki, krew żylna pobrana przyżyciowo z żyły ogonowej, oraz krew żylna-tętnicza pobrana pośmiertnie poprzez nakłucie serca, oraz nerki, których fragmenty zostały odpowiednio zabezpieczone w zależności od typu dalszych badań. Kandydatka do pomiaru stężenia VEGF-A w surowicy i moczu, oraz stężenia albumin w moczu, jak i stężenia kompleksu trombina-antytrombina w surowicy, oraz stężenia cząsteczek adhezyjnych zastosowała komercyjne testy immunoenzymatyczne. Do oznaczenia stężenia białka całkowitego w moczu wykorzystaną referencyjną metodą Lowry. Do oznaczenia

stężenia kreatyniny w surowicy i moczu oraz mocznika w surowicy wykorzystano komercyjne zestawy oparte o metody enzymatyczne. Aktywności metaloproteinaz w moczu oznaczone zostały z wykorzystaniem testów fluorometrycznych.

Zastosowanie metody Western blot pozwoliło na analizę poziomu VEGF-A w lizacie pochodzącym z nerek, a ekspresja VEGFR1 i VEGFR2 została oceniona metodą RT-PCR. Fragmenty nerek utrwalone w buforowanej formalinie zostały poddane analizie immunofluorescencyjnej z wykorzystaniem mikroskopu konfokalnego Zeiss LSM 710.

Szeroki panel metodyczny wymagał umiejętności i dużego zaangażowania ze strony Doktorantki.

Kandydatka podjęła się też analizy rozkurczu tętnic międzypłatowych nerek z wykorzystaniem miografu. Prosiłabym o wyjaśnienie kiedy ta procedura/analiza może być zakwalifikowana do metod *ex vivo* a w jakich warunkach do metod *in vitro*.

Uzyskane w rozprawie doktorskiej wyniki zostały poddane wnikliwej analizie statystycznej z wykorzystaniem wielu testów m.in. testu Shapiro-Wilka, testu t-Studenta lub testu U Manna-Whitneya, testu Wilcoxon, testu Kruskala-Wallisa oraz Tukey'a.

Cześć rozprawy obejmująca rozdział „Wyniki” liczy 15 stron łącznie z wykresami i tabelami. Autorka dopiero w tej części rozprawy wspomina o trzeciej pracy oryginalnej. W mojej opinii można było tę informację zamieścić już na początku rozprawy lub w rozdziale 10. wyjaśniając aktualny status tej publikacji.

W rozdziale 11. „Wyniki” pojawia się podrozdział 11.1, zatytułowany „Wyniki badań w cukrzycy długoterminowej”, jednak w mojej opinii powinny chronologicznie pojawić się w rozdziale 11. wyniki w oparciu o wybrane publikacje do cyklu z dodaniem niezłączonej publikacji nr 3 oznaczonej jako &. Tak więc sugerowałabym aby tabele z podrozdziału 11.2 były podsumowaniem podrozdziałów odpowiednio dedykowanym działaniu suraminy w cukrzycy krótkoterminowej (np. 11.1) i długoterminowej (np. 11.2), a zestawienie (tabele) z podrozdziału 11.2 jako podrozdział 11.3. Taki układ zapewniłby przejrzystość czytelnikowi.

Pragnę dodać, że zamieszczone zestawienie wyników w podrozdziale 11.2. jest interesującym podsumowaniem badań, które przeprowadziła Doktorantka dającym szybki pogląd do wygenerowanych wyników.

Jednak podczas analizy tego zestawienia nasuwa się kilka pytań z prośbą o wyjaśnienie:

- Dlaczego nie podjęto badań ekspresji białka VEGF-A w skrawkach nerek w modelu cukrzycy długoterminowej?

- Jaka jest przyczyna rozbieżności w ekspresji *Vegfr2* pomiędzy dwoma modelami?

- Dlaczego nie badano poziomu MMP i MMP-9 w modelu cukrzycy długoterminowej?
- Dlaczego nie badano białka całkowitego w modelu cukrzycy krótkoterminowej?
- Dlaczego nie badano stężenia kompleksu trombina-antytrombina (TAT) w surowicy w modelu cukrzycy krótkoterminowej?

Doktorantka podsumowała uzyskane przez Nią wyniki prac eksperymentalnych, formułując 5 wniosków. W tym miejscu z pewnością należy podkreślić elementy innowacyjne niniejszej rozprawy doktorskiej takie jak zastosowanie suraminy jako czynnika wpływającego na metabolizm osi VEGF-A/VEGFR w dwóch modelach badawczych krótko- i długoterminowej cukrzycy. Ponadto wykazanie nefroprotekcynnego działania suraminy w rozwoju nefropatii cukrzycowej oraz korzystnego działania suraminy na funkcję śródbłonna tętnic w nerkach.

Podsumowując uważam, że przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska jest kompleksowym i dojrzałym opracowaniem postawionego w celu badań problemu badawczego, i potwierdza dojrzałość naukową mgr Gabrieli Chyły-Danił.

Dlatego z pełnym przekonaniem stwierdzam, że przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska spełnia warunki określone w myśl obowiązującej Ustawy Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce z dnia 3 lipca 2018 r.

Wnoszę, zatem wniosek do Wysokiej Rady Nauk Farmaceutycznych Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie pani mgr Gabrieli Chyły-Danił do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

KIEROWNIK
Katedry i Zakładu
Biochemii Farmaceutycznej

prof. dr hab. Violetta Krajka-Kuźniak