



# UNIwersytet Medyczny IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH WE WROCLAWIU

## Katedra i Zakład Toksykologii

Kierownik: prof. dr hab. Agnieszka Piwowar

**Ocena rozprawy doktorskiej zatytułowanej "*Farmakologiczna modyfikacja stężenia czynnika wzrostu śródbłonna naczyń A (VEGF-A) w przebiegu cukrzycy typu 1; potencjalna strategia terapeutyczna ograniczająca rozwój nefropatii cukrzycowej*" autorstwa mgr Gabrieli Chyła-Danił, zrealizowanej w Zakładzie Chemii Klinicznej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego pod opieką promotorską prof. dr hab. Macieja Jankowskiego.**

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska została przygotowana w formie opracowania hybrydowego, w oparciu o monotematyczny cykl dwóch prac oryginalnych, opublikowanych w języku angielskim w czasopismach z listy JCR o uznanej renomie w środowisku naukowym oraz opisu przeprowadzonych eksperymentów i ich wyników, będących komplementarnym dopełnieniem badań zaplanowanych dla realizacji założonych celów badawczych. Podstawę ubiegania się o stopień doktora stanowią 2 publikacje oryginalne: praca nr 1 pt. „Suramin enhances the urinary excretion of VEGF-A in normoglycemic and streptozotocin-induced diabetic rats.” opublikowana w 2021 roku w *Pharmacological Reports* [2021,73(3):841-846] autorstwa doktorantki oraz 4 współautorów oraz praca nr 2 pt. „Suramin Affects the Renal VEGF-A/VEGFR Axis in Short-Term Streptozotocin-Induced Diabetes.” opublikowana w bieżącym roku w *Pharmaceuticals (Basel)* [2023,22;16(3):470] autorstwa Doktorantki i 8 innych współautorów. Uzupełnieniem, a w zasadzie kontynuacją ciągu zaplanowanych eksperymentów jest rozdział 11, będący opisem ostatniego etapu badań, którego wyniki na czas składania rozprawy były w trakcie procesu publikacyjnego, a na dzień wykonywania recenzji doktoratu praca już się ukazała w *International Journal of Molecular Sciences*, co potwierdza wysoką jakość przeprowadzonych przez Panią mgr badań, które znalazły uznanie na arenie międzynarodowej. Łączna punktacja MEiN tych dwóch publikacji wynosi 240, a wartość IF jest wysoka i wynosi 8,519. Wiodąca rola Doktorantki została potwierdzona stosownymi oświadczeniami współautorów dołączonymi do rozprawy doktorskiej, które wskazują, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część w tych pracach, wskazująca na indywidualny wkład Doktorantki w ich powstawaniu, polegała na opracowywaniu koncepcji, wykonywaniu części eksperymentalnej oraz opracowaniu i interpretacji wyników tych prac. W publikacji nr 2 udział ten został oszacowany przez

Doktorantkę na 55%, natomiast w publikacji nr 1 nie podano takiej informacji ale złożone oświadczenia współautorów i Doktorantki nie wzbudzają żadnych zastrzeżeń, co do wiodącej roli Pani mgr w ich powstawaniu. W obydwu tych publikacjach Pani mgr jest pierwszym autorem, a w publikacji nr 2 jest również autorem korespondencyjnym.

W mojej ocenie, poruszona przez Doktorantkę tematyka badawcza, dotycząca farmakologicznej modyfikacji stężenia czynnika wzrostu śródbłonna naczyń A (VEGF-A) w przebiegu cukrzycy typu 1 jako potencjalnego celu w strategii terapeutycznej ograniczającej rozwój nefropatii cukrzycowej jest aktualna i szczególnie istotna z uwagi na wciąż nie do końca zgłębiony mechanizm tego powikłania oraz stale utrzymujący się wysoki trend zachorowań na cukrzycę na Świecie. Badania zostały przeprowadzone w modelu zwierzęcym z indukowaną streptozoocyną cukrzycą, w obserwacji krótko- i długoterminowej. Rangę podjętego problemu naukowego wzmacnia fakt, iż cukrzyca, mimo zaawansowanych i rozwijających się procedur diagnostycznych i terapeutycznych należy wciąż do czołowych chorób cywilizacyjnych. Na uwagę i docenienie zasługuje także fakt, iż badania zostały zrealizowane ze środków pochodzących z trzech projektów, przy czym w dwóch Pani mgr była kierownikiem. Na przeprowadzenie badań na zwierzętach Doktorantka uzyskała zgodę Lokalnej Komisji Etycznej do spraw doświadczeń na zwierzętach.

Przedłożona do oceny rozprawa charakteryzuje się bardzo szczegółowym zestawieniem poszczególnych rozdziałów wchodzących w skład opracowania, których wg. spisu treści jest 15 i są one ułożone logicznie. Należy podkreślić dużą staranność i dbałość Doktorantki o wysoką jakość opracowania. Oprócz wykazu i kopii dwóch publikacji stanowiących podstawę ubiegania się o stopień dr n. farm. oraz oświadczeń wszystkich współautorów, opracowanie zawiera także informacje o innowacyjnym charakterze badań, wykaz najważniejszych użytych skrótów oraz streszczenie w języku polskim i angielskim. Rozprawa zawiera obszerny wstęp bardzo dobrze wprowadzający w podjęty temat badawczy. Równie obszerny jest rozdział zatytułowany „Materiały i metody”, na który składają się podrozdziały „Metody *in vitro*” oraz „Metody *ex vivo*”, co z uwagi na zastosowany bogaty warsztat badawczy jest bardzo dobrym uzupełnieniem rozprawy. Najważniejszymi elementami rozprawy doktorskiej, poza załączonymi kopiami publikacji, są rozdziały: 8 - „Cele pracy”, 11 - „Wyniki” i 12 - „Podsumowanie wyników” oraz rozdział 13 - „Wnioski”. Rozdział 14 stanowi spis piśmiennictwa użytego do napisania części opisowej rozprawy i oparty jest na 127 pozycjach literaturowych sięgających bieżącego roku. Doktorantka nie ustrzegła się jednak pewnych błędów, gdyż brakuje konsekwencji w zapisie przedstawionych danych bibliograficznych.

Informacje zamieszczone we wstępie rozprawy w sposób satysfakcjonujący i wyczerpujący wprowadza w temat rozprawy doktorskiej i podsumowuje aktualną wiedzę na temat epidemiologii i etiologii cukrzycy oraz jej najczęstszego powikłania mikronaczyniowego – nefropatii cukrzycowej. Doktorantka opisuje wielokierunkowe mechanizmy rozwoju nefropatii cukrzycowej, zwracając szczególną uwagę na czynniki odgrywające rolę w jej patogenezie i nasilaniu progresji, z podkreśleniem roli czynnika VEGF-A i jego receptora w stanach fizjologicznych i patologicznych. Ponadto Doktorantka charakteryzuje suraminę, jako potencjalny czynnik mogący modulować przebieg nefropatii i/lub zapobiegać jej

powstawaniu, co stało się wiodącym wątkiem podjętych przez Panią mgr badań. W mojej opinii „Wstęp” jest napisany w sposób przejrzysty i doskonale koresponduje z problemem naukowym, który został zdefiniowany w celu rozprawy. Bardzo dobrym uzupełnieniem jest zamieszczenie w tej części dysertacji schematów, które w znaczący sposób wzbogacają i uatrakcyjniają ten rozdział. Doktorantka w logiczny sposób uzasadnia ważność podjętego tematu badawczego, gdyż jak podają dane z piśmiennictwa, nefropatia cukrzycowa jest najczęstszym przewlekłym powikłaniem u pacjentów z cukrzycą typu 1, występującym u około 30% chorych, a na poziomie komórkowym charakteryzuje się dysfunkcją komórek śródbłonna naczyniowego i podocytów, w czym ważną rolę odgrywają zaburzenie w układzie czynników wzrostu i ich receptorów. Pani mgr zajęła się badaniem czynnika VEGF-A, jednego z głównych czynników regulujących proliferację, różnicowanie i przeżycie komórek śródbłonna oraz jego receptora. Choć udział tego czynnika w patogenezie i rozwoju nefropatii cukrzycowej jest znany, to jednak nowe ujęcie tematu przez Panią mgr jest bardzo interesujące, zwłaszcza we wskazywaniu nowych potencjalnych kierunków działań nefroprotektoryjnych poprzez modyfikację stężenia VEGF-A. Szczególnie interesującym jest podjęcie badań w zakresie wykorzystania pochodnej naftylomocznika – suraminy, stosowanej jako leku przeciwpasożytniczego, jako potencjalnego czynnika w opóźnianiu lub leczeniu zaburzeń cukrzycowych, gdyż mechanizm działania suraminy w nefropatii cukrzycowej nie jest dokładnie poznany.

Zasadnicze cele badań opisane w niniejszej rozprawie doktorskiej zostały sformułowane precyzyjnie w postaci jednego celu głównego oraz trzech celi szczegółowych. Jako cel główny Doktorantka określiła zbadanie czy działanie suraminy na nerki w cukrzycy może mieć charakter nefroprotektoryjny i jaki jest mechanizm tego działania. Natomiast postawiono cele szczegółowe dotyczyły zbadanie wpływu tej substancji na ekspresję VEGF-A oraz receptory dla VEGF-A w nerkach i jego stężenia we krwi i moczu, wpływu na funkcję wydalniczą nerek oraz na stymulowany acetylocholiną rozkurcz tętnic wewnątrznerkowych. W mojej opinii Doktorantka zrealizowała te cele poprzez logiczną sekwencję zaplanowanych badań oraz prawidłowo dobrane i zróżnicowane techniki badawcze. Badania przeprowadzono w modelu cukrzycy u zwierząt doświadczalnych, szczurów, u których indukowano cukrzycę poprzez dootrzewnowe podanie streptozotocyny (60 mg/kg m.c.). W taki sam sposób podawano zwierzętom suraminę (10 mg/kg m.c., co 7 dni). Badania przeprowadzono w obserwacji krótkoterminowej (3 tygodnie) i długoterminowej (12 tygodni). Takie podejście jest w pełni uzasadnione uwzględniając fakt, iż ryzyko rozwoju nefropatii cukrzycowej zwiększa się istotnie wraz z czasem trwania hiperglikemii. Tak zaplanowane i prowadzone badania świadczą o tym, iż Doktorantka bardzo dobrze zapoznała się z podstawami teoretycznymi zgłębianego tematu badawczego, co pozwoliło Jej na właściwe zbudowanie założeń hipotezy badawczej oraz zaplanowanie i przeprowadzenie wszystkich eksperymentów. Jedyna uwaga dotyczy braku konsekwencji w zapisie ilości podawanych zwierzętom substancji, gdyż zarówno w rozprawie jak i opublikowanych pracach brakuje zapisu, iż jest to ilość danej substancji na kilogram masy ciała.

Doktorantka wykorzystwała do badań materiał biologiczny (mocz pochodzący ze zbiórki dobowej, krew żylną pobraną przyżyciowo i krew żylną-tętniczną, pobrana pośmiertnie, oraz

materiał tkankowy – nerki pobrane pośmiertnie). W badaniach *in vitro* Doktorantka zmierzyła stężenie VEGF-A, a także stężenia rozpuszczalnych form cząsteczek adhezyjnych (sVCAM-1 i sICAM-1), albuminy i białka całkowitego, ponadto aktywności metaloproteinaz macierzy (całkowitej i MMP-9), stężenia kompleksu trombina-antytrombina oraz stężenie kreatyniny i mocznika, co pozwoliło na pełną charakterystykę funkcji nerek. Proces indukowania cukrzycy był monitorowany pomiarem stężenia glukozy we krwi pobranej z żyły ogonowej. Badania zostały przeprowadzone w czterech grupach zwierząt: dwóch badanych - u szczurów z indukowaną streptozotocyną cukrzycą i u zwierząt, z cukrzycą, którym podawano suraminę, oraz dwóch kontrolnych – szczurów zdrowych oraz zwierząt, którym podawano tylko suraminę. Pozwoliło to na uzyskanie obiektywnych warunków przeprowadzenia eksperymentów. Tak szczegółowe i wyczerpujące podejście do postawionego problemu naukowego umożliwiło uzyskanie interesujących i ważnych wyników. Panią mgr proszę jedynie o wskazania, jakie czynniki determinowały zastosowanie takich odstępów między podawaniem streptozotocyny a podawaniem suraminy, jak również zastosowane stężenie suraminy oraz czas prowadzenia badań w obydwu modelach, gdyż brak jest odnośnika literaturowego, który mógłby uzasadniać takie założenia. Doktorantka zastosowała także technikę Western Blot dla badania ekspresji białek VEGF-A i  $\beta$ -aktyny w homogenatach kłębuszków nerkowych oraz analizę immunofluorescencji bloczków parafinowych tkanki nerkowej. Ponadto zastosowała reakcję łańcuchowej polimerazy z odwrotną transkrypcją w czasie rzeczywistym (RT-PCR) dla oceny poziomu ekspresji genów *Vegfr1*, *Vegfr2* oraz  $\beta$ -aktyny. W badaniach *ex vivo* Doktorantka dokonała izolacji tętnic międzypłatowych nerek, co pozwoliło jej na pomiary rozkurczu tętnic międzypłatowych nerek zależnego od śródbłonka indukowanego acetylocholiną w obecności suraminy.

Uzyskane przez Doktorantkę wyniki w modelu długoterminowym cukrzycy, z uwagi na oczekiwanie na przyjęcie manuskryptu pracy przez redakcję czasopisma, zostały bardzo dobrze przedstawione, opisane i zobrazowane tabelami i wykresami w rozdziale 11.1. Z kolei w rozdziale 11.2 Pani mgr w sposób bardzo przejrzysty zestawiała i przedstawiała uzyskane wyniki wraz z analizą zmian w postaci tabel zbiorczych. W Tabeli 3 Pani mgr przedstawiła wyniki badań wpływu suraminy na oceniane parametry biochemiczne (stężenie białek, mocznika, kreatyniny oraz aktywność enzymatyczną), parametry molekularne (poziom białek i mRNA) oraz szacunkowy wskaźnik filtracji kłębuszkowej (eGFR) u szczurów z indukowaną streptozotocyną cukrzycą krótko- i długoterminową. W Tabeli 4 zebrała wyniki wpływu suraminy na stężenie glukozy, bilans wody oraz parametry żywieniowe u szczurów w obydwu modelach cukrzycy. Należy podkreślić przejrzystość przedstawionego zestawienia, gdzie Pani mgr oprócz wskazania w której tabeli, czy na której rycinie dane wyniki zostały przedstawione w publikacjach, co znacząco ułatwia orientację czytającemu po obszernym opracowaniu dysertacji, to również opisała jakiego charakteru są to zmiany, używając określenia „zmniejszenie/zwiększenie”, które oznacza istotną statystycznie, odpowiednią zmianę wartości badanego parametru lub brak zmian, co odzwierciedla określenie „nie stwierdzono”. Z kolei w Tabeli 5 Doktorantka zestawiała wyniki badań *ex vivo* – stymulowanego acetylocholiną rozkurczu tętnic międzypłatowych izolowanych z nerek szczurów z cukrzycą krótko- i długoterminową otrzymujących suraminę. Tutaj zaobserwowane zmiany zostały

przedstawione w sposób procentowy. Jest to bardzo dobry, nowatorski sposób przedstawienia uzyskanych wyników, co oprócz ich charakteru poznawczego i ważnego ze względów naukowych, stanowi dodatkowy czynnik decydujący o pozytywnej ze wszech miar opinii Recenzenta.

Uzyskane przez Panią mgr wyniki pokazały, że w obu badanych modelach doświadczalnej cukrzycy występowało zmniejszenie zdolności relaksacyjnych międzypłatowych tętnic nerkowych, co wydaje się obserwacją potwierdzającą upośledzenie tej funkcji w cukrzycy, natomiast co interesujące i ważne, podawanie suraminy przywracało właściwości relaksacyjne tętnic do poziomów obserwowanych u zwierząt z grupy kontrolnej. Podawanie suraminy nie wpływało na wydalanie albuminy z moczem, ale w cukrzycy długoterminowej hamowało rozwój białkomoczu. Ponadto Doktorantka wykazała, że w cukrzycy krótkoterminowej suramina powodowała zwiększone wydalanie czynnika VEGF-A z moczem oraz zmniejszenie ekspresji tego białka w kłębuszkach nerkowych. Zaobserwowany wzrost ekspresji receptora VEGFR-2 w cukrzycy krótkoterminowej ulegał spadkowi po podaniu suraminy. Takiego działania nie zaobserwowano po podaniu suraminy w cukrzycy długoterminowej. Natomiast w obu modelach doświadczalnej cukrzycy suramina nie wpływała na zmiany stężeń rozpuszczalnych form cząsteczek adhezji (sVCAM-1 i sICAM-1) ani też na aktywności metaloproteinaz.

Doktorantka sformułowała na tej podstawie 5 wniosków, które uważam za słuszne i spójne z uzyskanymi wynikami, choć wniosek pierwszy nie do końca koresponduje bezpośrednio z zasadniczymi celami rozprawy, a stanowi raczej potwierdzenie znanego już faktu ale może stanowić dobre uzupełnienie i wprowadzenie szerszego grona czytelników w podjęty temat badawczy. Pani mgr podkreśla, iż zaobserwowana poprawa funkcji śródbłonna naczyń tętnicznych nerek po podaniu suraminy, niezależnie od czasu trwania cukrzycy, sugeruje możliwość rozszerzenia zakresu terapeutycznego zastosowania tego leku, co uważam za bardzo cenną i trafną obserwację. Ponadto wykazane działanie hamujące suraminy na rozwój białkomoczu, mimo braku hamowania albuminurii, może również być ciekawą perspektywą dla jej zastosowania i jak wskazuje Pani mgr, może wynikać z przedłużonego i selektywnego efektu działania tej substancji. Uzasadnionym wydaje się kontynuacja tego kierunku badań, do czego zachęcam Panią mgr. Jak wskazuje Doktorantka, wpływ suraminy w cukrzycy krótkoterminowej na oś sygnalizacyjną VEGF-A/VEGFR-2 prawdopodobnie prowadzi do zmiany fenotypu komórek kłębuszkowej bariery filtracyjnej, co może mieć istotne znaczenie dla jej funkcjonowania, co także jest warte dalszego zgłębiania, gdyż, jak podaje Pani mgr, prawdopodobne jest, że mechanizm działania suraminy związany z wyżej wspomnianą osią sygnalizacyjną pozostaje aktywny tylko w początkowej fazie trwania cukrzycy, co sugeruje, że suramina może wspomagać wczesne efekty kompensacyjne zaburzeń mikroangiopatycznych, co otwiera dalsze perspektywy badań.

Reasumując, uzyskane przez Panią mgr Gabrielę Chyła-Danił wyniki uważam z całym przekonaniem za oryginalne i wartościowe dla rozwoju dyscypliny nauki farmaceutycznej, a formę ich prezentowania i dyskusowania z danymi światowymi za satysfakcjonującą i wyczerpującą. Doktorantka w sposób jasny sformułowała cele badawcze, umiejętnie dobrała odpowiednie narzędzia badawcze i zrealizowała postawione cele poprzez wykonanie

wielopłaszczyznowych eksperymentów. Uzyskane wyniki zaprezentowała bardzo przejrzysto, prawidłowo je analizując i interpretując, co dowodzi jej biegłości w obszarze badawczym i wskazuje zarazem na jej dojrzałość naukową, wymaganą od Kandydatów do stopnia doktora.

Przedłożona do oceny rozprawa doktorska Pani mgr Gabrieli Chyła-Danił zatytułowana „Farmakologiczna modyfikacja stężenia czynnika wzrostu śródbłonna naczyń A (VEGF-A) w przebiegu cukrzycy typu 1; potencjalna strategia terapeutyczna ograniczająca rozwój nefropatii cukrzycowej”, pod względem merytorycznym i formalnym spełnia warunki określone w art. 187 ust. 1 i 2 ustawy Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1668 ze zm.), zatem wnoszę do Rady Dyscypliny Nauki Farmaceutyczne Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie rozprawy mgr Gabrieli Chyła-Danił do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia naukowego doktora.

Mając na uwadze aktualność i ważność podjętego tematu badawczego, kompleksowość wykonanych badań i wysoki poziom naukowy przedstawionej do oceny rozprawy doktorskiej, oraz potencjalny aspekt aplikacyjny i fakt, iż przedstawione wyniki uzyskały uznanie międzynarodowe i zostały opublikowane w dwóch pracach oryginalnych, w których Doktorantka jest pierwszym autorem, wnioskuje o wyróżnienie ocenianej rozprawy.

Z poważaniem

Prof. dr hab. Agnieszka Piwowar

Wrocław, 12.11.2023r.

Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu  
KATEDRA I ZAKŁAD TOKSYKOLOGII  
Marszałki  
prof. dr hab. Agnieszka Piwowar