WARSZAWSKI
UNIWERSYTET
MEDYCZNY

ZAKŁAD MEDYCYNY LABORATORYJNEJ

Dr hab. n. med. Olga Ciepiela
Zakład Medycyny Laboratoryjnej
Warszawski Uniwersytet Medyczny
Ul. Banacha 1a, 02-097 Warszawa
Tel. 22 5992405
e-mail: olga.ciepiela@wum.edu.pl

Warszawa, 09.08.2023

Recenzja rozprawy doktorskiej

Mgr Marty Iwanickiej

pt. „Badania nad przeciwpłytkowymi mechanizmami działania donorów tlenku węgla"

Promotor pracy: dr hab. Karol Franciszek Kramkowski

Zgodnie z danymi Światowej Organizacji Zdrowia choroby sercowo-naczyniowe są główną przyczyną zgonów na świecie. Szacuje się, że rocznie z powodu takich zaburzeń jak choroba wieńcowa, choroby naczyń mózgowych czy choroba reumatyczna serca umiera niemal 18 milionów osób. Ponad 80% tych zgonów spowodowanych jest przez zawał mięśnia sercowego i udary. W przebiegu chorób sercowo-naczyniowych kluczowym czynnikiem decydującym o ich śmiertelności jest nadkrzepliwość, również związana z nadmierną aktywacją płytek krwi i ich agregacją. Na tych agregatach może dochodzić od aktywacji osoczowych czynników krzepnięcia, co w konsekwencji powoduje powstawanie skrzeplin zamykających światło naczynia krwionośnego i

niedotlenie kluczowych narządów, jak mięsień sercowy czy mózg. Pomimo znaczących postępów w farmakoterapii chorób sercowo-naczyniowych, śmiertelność z ich powodu nie ulega drastycznej poprawie, chociaż, co należy podkreślić – dotyka pacjentów w coraz starszym wieku.

Ze względu na istotny problem kliniczny jakim jest nadmierna aktywacja płytek krwi i indukcja stanu nadkrzepliwości, poszukiwanie nowych leków działających w sposób zmniejszający agregację płytek krwi i nie wywołujących ciężkich skutków ubocznych jest obecnie istotnym trendem w medycynie. Jednym z niedawno poznanych czynników działających ochronnie u pacjentów z chorobami sercowo-naczyniowymi wydaje się być tlenek węgla. Substancja ta w niewielkich ilościach produkowana jest endogennie i wywołuje efekt wazoregulacyjny, antyapoptotyczny i przeciwzapalny. Wykazano również korzystny wpływ CO na procesy prozakrzepowe, jednak nie ustalono dokładnie mechanizmu takiego działania. Dlatego badania nad mechanizmem działania tlenku węgla na płytki krwi, których podjęła się Doktorantka, uważam za niezwykle ważne i aktualne, ponieważ mogą przyczynić się do opracowania nowych schematów terapeutycznych u pacjentów z grupy ryzyka chorób zatorowo-zakrzepowych i sercowo-naczyniowych.

Przedstawiona mi do recenzji praca, zawarta w 120 stronach maszynopisu, ma typowy układ dla dysertacji doktorskich. Składa się z 11 głównych rozdziałów i wykazu stosowanych skrótów. Piśmiennictwo obejmuje 90 pozycji, z czego zaledwie 3 prace pochodzą z ostatnich 5 lat. Zdecydowana większość cytowanych prac została opublikowana w czasopismach zagranicznych ujętych w wykazie Journal Citation Reports. W rozprawie piśmiennictwo uporządkowane jest w kolejności alfabetycznej. W pracy Autorka umieściła 57 rycin i 11 tabel, które w sposób wyczerpujący prezentują założenia teoretyczne i wyniki rozprawy. Pod względem edytorskim praca przygotowana jest bardzo dobrze, uwagę zwraca duża staranność Doktorantki w przygotowaniu rozprawy.

ul. Banacha 1a
02-097 Warszawa
www.wum.edu.pl

tel.: +48 22 599 24 05; 22 599 10 63
faks: +48 22 599 21 04
zml@wum.edu.pl

We wstępie Doktorantka opisuje modele hemostazy oraz szczegółowe mechanizmy krzepnięcia w modelu komórkowym. Z ogromną dokładnością zostały przygotowane podrozdziały dotyczące gazoprzekaźników i ich udziału w procesie aktywacji, adhezji i agregacji płytek krwi. Podrozdział dotyczący statystyk umieralności jest również opracowany starannie, jednak nie wydaje się, aby był on kluczowy dla pracy i wnosił istotne informacje. Sądzę, że bardziej zasadną częścią wstępu byłby podrozdział opisujący stosowane obecnie schematy terapeutyczne oparte o leki przeciwpłytkowe. Podkreślę jednak, że w żaden sposób nie umniejsza to naukowej wartości pracy i jej głównemu tematowi. Pod względem redakcyjnym ta część rozprawy jest napisana bardzo dobrze, choć Doktorantka nie uniknęła nielicznych literówek czy nieścisłości. Wspomnę chociażby o nie do końca właściwym użyciu słowa „komórka macierzysta" w odniesieniu do płytki krwi, z której uwalniane są mikropęcherzyki (komórka macierzysta w hematologii odnosi się do komórki pnia, z której wywodzą się inne komórki - zastosowanie tego sformułowania w innym kontekście może być mylące); czy też kilkukrotnym powtórzeniu słowa „rolling" w tabeli 4 zamiast zastosowania słowa „toczenie", które w polskiej nomenklaturze odnosi się do procesu powolnego przylegania czy to płytki krwi czy leukocytów do śródbłonka naczyniowego, zanim dojdzie do ich pełnej aktywacji i agregacji (PLT) czy diapedezy (leukocyty).

W oparciu o wstęp teoretyczny Autorka postawiła sobie cel badawczy, którym była szczegółowa ocena przeciwpłytkowego działania donorów tlenku węgla na przykładzie CORM-A1.

W rozdziale Materiały i Metody Doktorantka szczegółowo opisuje zastosowane metody badawcze jak i badany materiał, podkreślając pozytywną opinię właściwej Komisji Bioetycznej dotyczącą przeprowadzanych badań. W mojej opinii warto by dodać kopię tej opinii do całej rozprawy. W przypadku opisu metod mam jedną uwagę dotyczącą cytometrii przepływowej - Autorka wymienia, że bogatopłytkowe osocze było znakowane aneksyną V sprzężoną z FITC jak również cząsteczką CD62. Wydaje mi się jednak, że Autorka miała na myśli przeciwciało monoklonalne anty-CD62 (czyli skierowane przeciwko P-selektynie) sprzężone z konkretnym fluorochromem. Na podstawie dalszego tekstu wnioskuję, że tym fluorochromem była fikoerytryna (PE).

Sugeruję, aby dopilnować przy przygotowywaniu publikacji z wynikami pracy, aby w opisie metod znalazła się właściwa informacja na temat metody oceny ekspresji P-selektyny na powierzchni płytek krwi. Kolejną z metod badawczych, które Doktorantka stosowała, był pomiar sygnału wapniowego za pomocą barwnika Fura-2/AM. Metoda ta jak najbardziej jest zasadna i wyniki dzięki niej są bardzo wartościowe, jednak pozwolę sobie zasugerować, że mając do dyspozycji cytometr przepływowy wyposażony w laser argonowy i co najmniej dwa detektory fluorescencji (jak ten wymieniony w rozprawie), warto by sięgnąć po metodę z dwoma barwnikami fluorescencyjnymi (Fluo-3 i Fura-red), których wzajemne zmiany intensywności świecenia lepiej obrazowałyby zmiany wewnątrzkomórkowej dystrybucji jonów wapnia w komórkach. Być może w dalszych badaniach Autorka mogłaby sięgnąć po tę metodę badawczą. Pozostałe metody, jak chociażby ocena retrakcji skrzepu czy też tromboelastometria są opisane z ogromną uważnością. Co więcej, dobór metod badawczych wskazuje na doskonałe obeznanie się Doktorantki z problemem badawczym, ponieważ każda z nich pozwala na otrzymanie wartościowych wyników zgłębiających mechanizm działania CO na płytki krwi.

W rozdziale 4 „Wyniki" Doktorantka, metoda po metodzie, opisuje uzyskane przez siebie rezultaty badań. Na początku rozdziału Autorka podaje, że eksperymenty były wykonywane w 12-15 powtórzeniach, co jest w zupełności wystarczające i pozwalające na przeprowadzenie wiarygodnej analizy statystycznej. Wszystkie wyniki Autorka przedstawia w formie opisowej i w formie rycin. Pozwolę sobie jedynie zwrócić uwagę, że rycina w pracach naukowych powinna „żyć własnym życiem", a więc opis pod nią powinien być niezwykle wyczerpujący. Dlatego w przypadku ryciny 31 warto by w jej legendzie podać rozwinięcia skrótów, a w pozostałych liczbę powtórzeń eksperymentu. Podkreślę jednak, że uwaga ta w żaden sposób nie odnosi się do wartości merytorycznej omawianego rozdziału.

W trakcie swoich szeroko zakrojonych badań Doktorantka wykazała, co następuje:

- W zależności od czynnika pobudzającego płytki, zahamowanie tego procesu o połowę wymaga użycia donora CO w różnych stężeniach
- Zahamowanie agregacji płytek krwi zależnej od różnych czynników stymulujących wymaga użycia donora CO w różnych stężeniach, jednak w większości przypadków CORM-A1 w stężeniu 250 μM jest już efektywny

- Dużo niższe stężenia CORM-A1 wystarczą do zahamowania uwalniania ATP z płytek, niż do zahamowania ich agregacji
- Donor CO skutecznie zmniejsza uwalnianie jonów wapnia z płytek krwi (tu uwaga recenzenta – dlaczego na części rycin pokazano działanie donora w stężeniu mikromolowym a w innych milimolowych, pomimo tego że wciąż używano tych samych stężeń?)
- Już 100 μM CORM-A1 zmniejsza ekspresję P-selektyny i fosfatydyloseryny na powierzchni aktywowanych płytek krwi oraz uwalnianie mikropęcherzyków płytkowych
- Donor CO hamuje wytwarzanie mleczanu przez płytki krwi w zależności od substratu reakcji, wpływa więc na konkretny etap glikolizy
- CORM-A1 wpływa na dynamikę retrakcji skrzepu, jednak jej nie zapobiega
- CORM-A1 w stężeniu 500 μM modyfikuje krzywą tromboelastometryczną, a więc może wpływać na proces wykrzepiania *in vivo*

Podsumowując tę część pracy muszę przyznać, że eksperymenty zostały doskonale zaplanowane, ich wyniki przedstawione bardzo czytelnie, a forma w jakiej Doktorantka je przedstawiła sprawia, że czyta się je bardzo płynnie i z ogromną przyjemnością. Uzyskane wyniki są wysoce oryginalne i z całą pewnością powinny być udostępnione w literaturze międzynarodowej jako istotny wkład w rozwój badań nad mechanizmami zapobiegania agregacji i aktywacji płytek krwi.

Rozbudowana i płynnie prowadzona dyskusja wyników wskazuje na dużą dojrzałość naukową Doktorantki. Podobnie jak poprzednie części dysertacji, czyta się ją z ogromną przyjemnością. Ze względu na oryginalność pracy dostępna literatura, z którą Doktorantka mogłaby porównywać swoje wyniki, jest bardzo ograniczona. Jednak należy podkreślić, że w oparciu o dane literaturowe Doktorantka właściwie definiuje mechanizmy, które doprowadziły do uzyskanych przez nią wyników. Dlatego uważam ten rozdział za niezwykle wartościowy, który podkreśla wysoką wartość naukową przedstawionej rozprawy.

W rozdziale 6, na podstawie przeprowadzonych przez siebie badań, Doktorantka przedstawia 7 wniosków. W tym przypadku również Autorka potwierdza swoją dojrzałość naukową, ponieważ rozdział ten przedstawia faktyczne wnioski a nie podsumowanie wyników, co niestety bardzo często w tego typu pracach się zdarza.

Podsumowując, rozprawę na stopień naukowy doktora nauk medycznych mgr Marty Iwanickiej oceniam bardzo wysoko. Doktorantka wykazała dobre przygotowanie teoretyczne, opanowanie warsztatu badawczego oraz umiejętność analizy uzyskanych wyników. Wyniki rozprawy mogą stać się podstawą do opracowania nowych metod terapeutycznych w chorobach sercowo-naczyniowych, u podłoża których leży nadmierna aktywacja płytek krwi i powinny zostać przedstawione w formie pełnych publikacji międzynarodowemu gremium naukowemu.

W mojej ocenie rozprawa spełnia warunki określone w art.187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U.2018 poz.1668), dlatego wnoszę do Wysokiego Senatu Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku o dopuszczenie pani mgr Marty Iwanickiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie, ze względu na wysoką wartość naukową uzyskanych wyników, wnoszę o wyróżnienie rozprawy.

KIEROWNIK
Zakładu Medycyny Laboratoryjnej
Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego
dr hab. n. med. Olga Ciepiela

ul. Banacha 1a
02-097 Warszawa
www.wum.edu.pl

tel.: +48 22 599 24 05; 22 599 10 63
faks: +48 22 599 21 04
zml@wum.edu.pl