



AUTOREFERAT

Załącznik 2a

dr n. med. Tomasz Rusak

Zakład Chemii Fizycznej

Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

Kierownik Zakładu: prof. dr hab. Marian Tomasiak

Białystok 2017

1. **Imię i nazwisko:** Tomasz Rusak

2. **Posiadane dyplomy, stopnie naukowe – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytuły pracy magisterskiej/rozprawy doktorskiej.**

2000 r. Dyplom magistra chemii, Wydział Biologiczno-Chemiczny, Uniwersytet w Białymstoku. Tytuł pracy magisterskiej: „Synteza inhibitorów plazminy o strukturze peptydowej”.

2004 r. Dyplom doktora nauk medycznych, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej, Akademia Medyczna w Białymstoku (obecnie Uniwersytet Medyczny). Temat rozprawy doktorskiej: „Poszukiwanie mechanizmu(ów) oddziaływania nadtenoazotynu na płytki krwi”. (promotor: dr hab. Marian Tomasiak)

3. **Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych.**

UNIwersytet Medyczny w Białymstoku

1.10.2000 r. - 1.10.2008 r. Asystent w Zakładzie Chemii Fizycznej Akademii Medycznej/Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku

1.10.2008 r. - obecnie Adiunkt w Zakładzie Chemii Fizycznej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku

4. **Wskazanie osiągnięcia* wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.):**

A) tytuł osiągnięcia naukowego:

Zgodnie z treścią ww. ustawy osiągnięciem naukowym jest cykl powiązanych tematycznie prac, objętych wspólnym tytułem:

„Kinetyka procesu obkurczania skrzepu. Rola płytek krwi oraz reaktywnych form tlenu i azotu”.

Łączny **Impact Factor** ISI: **17.261**; punktacja **MNiSW**: **150**.

B) Wykaz publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe (autor/autorzy, tytuł/tytuły publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa):

1. Misztal T, **Rusak T**, Tomasiak M. Peroxynitrite may affect clot retraction in human blood through the inhibition of platelet mitochondrial energy production. *Thrombosis Research* 2014; 133(3):402-411.

Impact Factor ISI: 2.447; punktacja MNiSW: 25

Mój wkład: udział w opracowaniu koncepcji pracy, wykonanie części oznaczeń, analiza statystyczna, opracowanie wyników i dyskusja nad wynikami, przygotowanie i edycja manuskryptu. Udział procentowy: 55 %.

2. Misztal T, **Rusak T**, Brańska-Januszewska J, Ostrowska H, Tomasiak M. Peroxynitrite may affect fibrinolysis via the reduction of platelet-related fibrinolysis resistance and alteration of clot structure. *Free Radical Biology & Medicine* 2015; 89:533-547.

Impact factor ISI: 5.784; punktacja MNiSW: 40

Mój wkład: udział w opracowaniu koncepcji pracy, wykonanie części oznaczeń, analiza i interpretacja wyników, edycja manuskryptu. Udział procentowy: 45%.

3. Misztal T, **Rusak T**, Tomasiak M. Clinically relevant HOCl concentrations reduce clot retraction rate via the inhibition of energy production in platelet mitochondria. *Free Radical Research* 2014; 48(12):1443-1453.

Impact factor ISI: 2.976; punktacja MNiSW: 25

Mój wkład: wykonanie oznaczeń, analiza i interpretacja wyników, przygotowanie i edycja manuskryptu. Udział procentowy: 45 %.

4. **Rusak T**, Ciborowski M, Uchimiak-Owiczko A, Piszcz J, Radziwon P, Tomasiak M. Evaluation of hemostatic balance in blood from patients with polycythemia vera by means of thromboelastography: The effect of isovolemic erythrocytapheresis. *Platelets* 2012; 23(6):455-462.

Impact factor ISI: 2.240; punktacja MNiSW: 20

Mój wkład: opracowanie koncepcji badań, zabezpieczenie i przygotowanie próbek krwi do analizy, wykonanie oznaczeń, opracowanie i interpretacja wyników analiz statystycznych, opracowanie i analiza wyników, zebranie piśmiennictwa, przygotowanie i edycja manuskryptu. Udział procentowy: 85%.

5. **Rusak T**, Piszcz J, Misztal T, Brańska-Januszewska J, Tomasiak M. Platelet-related fibrinolysis resistance in patients suffering from PV. Impact of clot retraction and isovolemic erythrocytapheresis. *Thrombosis Research* 2014; 134(1):192-198.

Impact factor ISI: 2.447; punktacja MNiSW: 25

Mój wkład: opracowanie koncepcji i planu pracy, zabezpieczenie i przygotowanie próbek krwi do analizy, wykonanie oznaczeń (badania kinetyki retrakcji i fibrynolizy), interpretacja wyników analiz statystycznych, opracowanie wyników i dyskusja nad wynikami, zebranie piśmiennictwa, przygotowanie i edycja manuskryptu. Udział procentowy: 80%.

6. **Rusak T**, Misztal T, Rusak M, Branska-Januszewska J, Tomasiak M. Involvement of hyperglycemia in the development of platelet procoagulant response: the role of aldose reductase and platelet swelling. *Blood Coagulation & Fibrinolysis*, 2017, 28(6):443-451.

Impact factor ISI: 1.367; punktacja MNiSW: 15

Mój wkład: zaprojektowanie planu badań oraz eksperymentów, zabezpieczenie i przygotowanie próbek krwi do analizy, wykonanie większości oznaczeń, analiza i interpretacja wyników, przygotowanie rycin i tabel, przygotowanie i edycja manuskryptu, autor korespondencyjny. Udział procentowy 85%.

C) omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.

Moje zainteresowania naukowe od początku kariery zawodowej dotyczyły płytek krwi oraz ich roli w generowaniu odpowiedzi prokoagulacyjnej i wytworzeniu skrzepu. Płytki krwi są najmniejszymi elementami morfotycznymi krążącymi we krwi. Należą one do komórek pobudliwych i przez cały okres swojego życia pozostają w stałej gotowości do odpowiedzi (agregacja, adhezja, sekrecja, odpowiedź prokoagulacyjna) mających na celu utrzymać hemostazę (1). Nazwą „hemostaza” określa się szereg mechanizmów mających na celu z jednej strony zapobiegać utracie krwi, a z drugiej zapewnić utrzymanie ciągłości jej przepływu. W normalnych warunkach aktywację płytek krwi ograniczają komórki śródbłonna, które stale produkują substancje hamujące agregację i adhezję tych komórek. W wyniku uszkodzenia śródbłonna odsłonięciu ulegają białka będące stymulatorami płytek (np. kolagen), a lokalne stężenie inhibitorów aktywacji płytek ulega obniżeniu. Pod wpływem kontaktu z swoistymi stymulatorami płytki krwi ulegają aktywacji, co przejawia się ich zmianą kształtu. Przylegają one (ulegają adhezji) do miejsca uszkodzenia, a następnie zlepiają się z sobą (agregacja) prowadząc do powstania czopu płytkowego (2). Dodatkowo odpowiedzialne są one za uwalnianie szeregu substancji, które biorą udział w aktywacji kolejnych płytek bądź uczestniczą w krzepnięciu krwi. Na powierzchni aktywowanych płytek pojawiają się ujemnie naładowane fosfolipidy (głównie fosfatydyloseryna i fosfatydyloetanolamina), które stanowią powierzchnię katalityczną, na której zachodzi aktywacja osoczowych czynników krzepnięcia. Fosfolipidy te wykazują zdolność do tworzenia kompleksów z czynnikami krzepnięcia: IXa-VIIIa-X (kompleks tenazy) i Va-Xa (kompleks protrombinazy). W efekcie finalnym dochodzi do powstawania trombiny

odpowiadającej za przekształcenie osocznego fibrynogenu w sieć przestrzenną fibryny, która stabilizuje powstały czop płytkowy (3, 4). Przyjmuje się, że proces krzepnięcia na powierzchni aktywowanych płytek zachodzi 150-300 tys. razy szybciej, niż w fazie płynnej osocza (5, 6). Tak szybka i miejscowa aktywacja umożliwia lokalizację procesu krzepnięcia tylko do miejsca uszkodzenia naczynia, co przyczynia się do zatrzymania krwawienia. Powstający w świetle naczynia skrzep może jednak utrudniać przepływ krwi prowadząc do niedotlenienia tkanek. Dlatego powinien być on odpowiednio przemodelowany. Zasadniczą rolę pełnią tutaj procesy retrakcji (obkurczania skrzepu) i fibrynolizy (rozpuszczania powstałego skrzepu) (4, 7, 8). Obkurczenie skrzepu znacznie zmniejsza ryzyko wystąpienia burzliwego przepływu krwi i wysokich wartości naprężeń ścinających (ang. *shear stress*), które mogą prowadzić do spontanicznej aktywacji kolejnych napływających wraz z strumieniem krwi płytek (7, 9). W takich warunkach znacznie częściej dochodzi do powikłań zakrzepowo-zatorowych prowadzących m.in.: do zawału mięśnia sercowego, udaru niedokrwiennego mózgu czy zakrzepicy żył głębokich. Zatem powstanie i obkurczanie gęstego skrzepu fibrynowo-płytkowego można traktować jako jeden z mechanizmów limitujących stopień rozrostu skrzepu, ograniczający niekontrolowaną (patologiczną) odpowiedź zakrzepową. Dodatkowo obkurczony skrzep silniej przywiera do ściany naczynia, co zapobiega jego odrywaniu przez prąd krwi, a tym samym ogranicza ryzyko embolizacji mniejszych naczyń krwionośnych przez oderwane fragmenty skrzepu. Pomimo, że zjawisko retrakcji skrzepu opisano po raz pierwszy już pod koniec XVIII w. (10), to do chwili obecnej nie poznano wszystkich mechanizmów odpowiedzialnych za przebieg tego procesu. Dotychczasowe badania retrakcji skrzepu ograniczały się głównie do określenia końcowej objętości utworzonego skrzepu i/lub ilości wyciśniętego osocza. Ważne jest jednak poznanie dokładnej kinetyki obkurczania skrzepu, co pozwala na oznaczenie okresu anoksji (niedotlenienia tkanek wywołanego zatrzymaniem przepływu w zaczopowanym naczyniu). Rozwój i zastosowanie fotografii cyfrowej pozwalają obecnie na rejestrację zmian objętości powstałego skrzepu w czasie. Dlatego też w Zakładzie Chemii Fizycznej UMB podjęliśmy próby opracowania metod, które umożliwiają dokładne określenie kinetyki retrakcji, zarówno we krwi pełnej, jak i w osoczu bogatopłytkowym, czy w układach o ustalonym składzie środowiska. Tego typu badania pozwalają nam na lepsze poznanie mechanizmu regulujących

proces obkurczania skrzepu. Pomiar kinetyki retrakcji umożliwia także określenie czasu niedokrwienia, wynikającego z zablokowania przepływu krwi przez skrzep.

Główny nurt prowadzonych przeze mnie badań, stanowiących podstawę osiągnięcia naukowego przedłożonego do oceny, koncentruje się na roli płytek krwi w procesie powstawania skrzepu, jego stabilizacji oraz kinetyki obkurczania i fibrylizacji. W wyniku aktywacji krzepnięcia, produkowana w dużych ilościach trombina (na powierzchni aktywowanych płytek) powoduje jednoczesne powstawanie sieci fibrynowej i zmianę konformacji płytkowych receptorów GP IIb/IIIa, które wiążąc się z fibrynogenem pośredniczą w przekazywaniu siły kurczliwej od aktomiozyny płytkowej do sieci fibrynowej lub kolejnych płytek krwi (3, 4). Wiele uwagi poświęciłem też reaktywnym formom tlenu i azotu, które pełnią istotną rolę w patogenezie chorób układu sercowo-naczyniowego, i jak wykazano w wielu badaniach *in vitro* mogą one wpływać na płytki krwi powodując zaburzenia hemostazy. Wyjaśnienie mechanizmów kontrolujących proces obkurczenia skrzepu czy zjawisk odpowiedzialnych za właściwości mechaniczne utworzonego skrzepu może mieć kluczowe znaczenie w profilaktyce i leczeniu incydentów zakrzepowych.

Wyniki dotychczas prowadzonych badań krzepnięcia wykazują, że pojawiające się mediatory stanu zapalnego powodują aktywację układu krzepnięcia, wpływają na płytki krwi i doprowadzają do dysfunkcji śródbłonna (utrata przeciwzakrzepowych i przeciw płytkowych właściwości, zwiększona ekspresja czynnika tkankowego), a także zmniejszają aktywność fibrynolityczną. Wśród substancji produkowanych przez aktywowane komórki stanu zapalnego, które wykazują takie działanie szczególną rolę przypisuje się reaktywnym formom tlenu i azotu (11-13). Jedną z nich jest nadtlenoazotyn (ONOO^-) powstający *in vivo* w reakcji tlenku azotu (NO^\bullet) i anionorodnika ponadtlenkowego ($\text{O}_2^{\bullet-}$). Długotrwałe infekcje bakteryjne lub wirusowe mogą doprowadzać do wytworzenia dużych ilości NO^\bullet i $\text{O}_2^{\bullet-}$ produkowanych przez aktywowane komórki układu odpornościowego. Opracowana i ustawiona przez mnie metoda uzyskiwania ONOO^- , w stężeniach znacznie wyższych niż komercyjnie dostępne preparaty, umożliwiła nam przeprowadzenie szeregu badań z wykorzystaniem tego związku. Jak przedstawiono w pracy nr 1 z cyklu publikacji ("*Peroxynitrite may affect clot retraction in human blood through the inhibition of platelet mitochondrial energy production*" *Thromb Res.* 2014; 133(3):402-411) w stężeniach bliskim tym jakie mogą pojawiać się w warunkach fizjologicznych, ONOO^- w sposób zależny od stężenia, powodował zmniejszenie szybkości

obkurczania skrzepu. Zaobserwowano, że efekt działania ONOO^- związany był z składem środowiska, w jakim ten związek działał. Najbardziej widoczne było to w środowisku sztucznym, gdzie obecne są jedynie płytki krwi i fibrynogen ($\text{IC}_{50}=25 \text{ nM}$), podczas gdy w osoczu bogatopłytkowym ($\text{IC}_{50}=75 \text{ }\mu\text{M}$) czy we krwi pełnej ($\text{IC}_{50}=120 \text{ }\mu\text{M}$) działanie hamujące obserwowano dopiero przy znacznie wyższych stężeniach. Przypuszczalnie wynika to z wysokiej reaktywności tego związku i potencjalne zwiększenie substratów/celów działania ONOO^- ogranicza jego działanie na płytki krwi i szybkość retrakcji. O znaczącym udziale działania nadtlenoazotynu na płytki świadczą też wyniki badań, w których wykazano hamujące działanie nadtlenoazotynu na polimeryzację fibryny w stężeniach znacznie wyższych ($>300 \text{ }\mu\text{M}$), niż te które wpływały na szybkość obkurczania skrzepów (14). Zarówno moje wcześniejsze badania (15), jak i wyniki zaprezentowane w omawianej pracy wykazały, że nadtlenoazotyn może wpływać na metabolizm energetyczny płytek krwi. Retrakcja skrzepu jest bowiem procesem wymagającym dużych nakładów energetycznych, gdzie dostępność ATP jest kluczowa dla skurczu aktomiozyny płytkowej (16). Wykazano, że zarówno w obecności ONOO^- , jak i inhibitorów fosforylacji oksydacyjnej (*m*-chlorofenylohydrazon cyjanku karbonylu – CCCP, czy KCN), w sposób zależny od stężenia, dochodzi zarówno do zmniejszenia produkcji energii w płytkach, jak i hamowania retrakcji skrzepu. Podobne wyniki uzyskano stosując cytochalazynę B, będącą inhibitorem polimeryzacji monomerycznej (globularnej) formy aktyny do postaci fibrylarniej. Skrzepy powstające w obecności tych związków znacznie wolniej się obkurczały, co mogło wynikać z zmian w strukturze przestrzennej skrzepów (14).

Hamujące działanie ONOO^- na retrakcję obserwowano zarówno po dodaniu natywnego preparatu (bolus), jak i 3-morfolinosydnoniminy (SIN-1) - związku będącego jednoczesnym donorem NO^\bullet i $\text{O}_2^{\bullet-}$. W założeniu odzwierciedla to sytuację *in vivo*, gdzie produkowane przez aktywowane komórki stanu zapalnego $\text{O}_2^{\bullet-}$ i NO^\bullet reagują ze sobą tworząc ONOO^- . Niewykluczone więc, że pojawiający się lokalnie nadtlenoazotyn w warunkach fizjologicznych, wpływając na metabolizm energetyczny płytek będzie doprowadzał do zaburzeń hemostazy (zwłaszcza retrakcji).

Dalsze badania przy użyciu mikroskopii konfokalnej wykazały, że skrzepy powstające w obecności ONOO^- , były znacznie słabiej usieciowane, a tworzące je włókna fibryny były grubsze niż w próbach kontrolnych („*Peroxynitrite may affect fibrinolysis via the reduction of*

platelet-related fibrinolysis resistance and alteration of clot structure” *Free Rad. Biol. Med.* 2015; 89:533-547). Wykazano, że wraz z wzrostem stężenia nadtlenoazotynu (50-300 μM), średnica włókien fibryny wzrastała, a ich ilość przypadających na każde 10 μm skrzepu ulegała obniżeniu. Znacznie słabiej usieciowione skrzepy nie tylko słabiej się obkurczały, ale dodatkowo były bardziej podatne na działanie czynników fibrynolitycznych. Wykazano, że wraz z wzrostem stężenia ONOO^- wzrastała szybkość rozpuszczania skrzepów. Podobne działanie wykazywały wspomniane wcześniej inhibitory produkcji energii, czy tirofiban będący antagonistą receptorów płytkowych GPIIb/IIIa. Zablokowanie receptorów płytkowych wiążących się z fibrynogenem doprowadzało do zahamowania retrakcji skrzepu i przyśpieszenia fibrynolizy. Pozwala to wysnuć wniosek, że procesy retrakcji i fibrynolizy są z sobą powiązane i zahamowanie jednego z nich (retrakcji) skutkuje wzrostem szybkości drugiego (fibrynolizy). Nasze badania wykazały, że zwiększenie szybkości fibrynolizy może być powiązane z hamowaniem ekspresji fosfatydyloseryny na aktywowanych płytkach (17). Obszary bogate w fosfatydyloserynę stanowią bowiem powierzchnię katalityczną, na której dochodzi do szybkiej syntezy trombiny. Wzrost stężenia trombiny przyczynia się powstawania gęstych, bardziej usieciowanych skrzepów, a w przypadku niższych stężeń trombiny powstają grubsze włókna fibrynowe, ale znacznie słabiej usieciowane (18). Co interesujące nadtlenoazotyn dodany do osocza ubogopłytkowego (pozbawionego płytek), praktycznie nie wpływał na kinetykę fibrynolizy, a w wysokich stężeniach ($\sim 1 \text{ mM}$) wykazywał działanie hamujące (17).

Podobne działanie na retrakcję skrzepu wykazuje kwas chlorowy (I) (HOCl), co wykazano w pracy nr 3 wchodzącej w skład omawianego cyklu („*Clinically relevant HOCl concentrations reduce clot retraction rate via the inhibition of energy production in platelet mitochondria*”). *Free Rad. Res.* 2014; 48(12):1443-1453). Aktywowane komórki stanu zapalnego w wyniku kontaktu z patogenami doprowadzają do powstania dużych ilości reaktywnych form tlenu. Obecna w ziarnistościach neutrofilów oraz w ziarnistościach monocytów i eozynofili mieloperoksydaza, przy współudziale H_2O_2 utlenia jony chlorkowe do HOCl (19), który wpływając na osoczowe czynniki krzepnięcia i płytki krwi, może doprowadzać do zaburzeń hemostazy. Przez długi czas uważano, że do zahamowania odpowiedzi płytek wymagane były relatywnie wysokie stężenia HOCl (milimolarne), podczas gdy nasze badania wykazały, że związek ten może oddziaływać na proces hemostazy

w stężeniach bliskim tym jakie mogą pojawiać się *in vivo*. Wykazano, że w sposób zależny od stężenia, związek ten wpływał na zahamowanie retrakcji we krwi pełnej ($IC_{50}=360 \mu M$), PRP ($IC_{50}=250 \mu M$), jak i w środowisku sztucznym zawierającym płytki krwi i fibrynogen ($IC_{50}=100 \text{ nM HOCl}$). Prawdopodobnie niższa podatność skrzepów na działanie HOCl we krwi pełnej i w osoczu, wynika z obecności większej ilości celów/związków na które może działać ten utleniacz. Dodatkowo zaobserwowano, że wraz z wzrostem stężenia HOCl obniżeniu ulega całkowita zawartość ATP w płytkach krwi. Zatem hamowanie retrakcji związane może być z hamowaniem produkcji energii przez mitochondria płytkowe. Wykazano, że pod wpływem tego związku (50 – 500 μM) dochodzi do ograniczenia poboru tlenu przez płytki, jak i zmniejszenia mitochondrialnego potencjału błonowego. Zjawiska te świadczą o ograniczonej produkcji ATP na drodze fosforylacji oksydacyjnej, co przyczynia się do upośledzenia retrakcji skrzepu. Co interesujące, w przypadku dodania do saponizowanych płytek zewnętrznego Mg-ATP można znieść hamujące działanie HOCl na retrakcję skrzepu. Ponieważ HOCl wykazuje podobne działanie jak $ONOO^-$ wykazano, że związki te mogą działać synergistycznie i do zahamowania retrakcji przy ich jednoczesnym podaniu wymagane są znacznie niższe stężenia. Zwiększa to zatem prawdopodobieństwo, że związki te mogą przyczyniać się do upośledzenia procesu retrakcji w warunkach fizjologicznych (20).

W warunkach fizjologicznych, gdzie aktywowane komórki stanu zapalnego doprowadzają do zwiększonej produkcji reaktywnych form tlenu i azotu, należy oczekiwać zaburzeń retrakcji. Taka sytuacja może zachodzić w astmie, gdzie permanentnie aktywowane komórki stanu zapalnego mogą produkować: nadtlenuk wodoru, tlenek azotu, nadtlenoazotyn czy kwas chlorowy (I) (10, 21). Wyniki uzyskane przez zespół badawczy, którego byłem członkiem, wykazały, że u takich pacjentów obserwuje się znacznie wolniejszą retrakcję. Niewykluczone, że kluczową rolę odgrywają tu zwiększone stężenia $ONOO^-$ i HClO, które wpływają na upośledzenie produkcji energii w mitochondriach płytkowych (22). Spowolniona retrakcja oraz upośledzona fibrynoliza u pacjentów z astmą może przyczyniać się do dłuższego okresu utrzymywania się wytworzonego skrzepu w świetle naczynia krwionośnego (23) oraz stanowić jeden z mechanizmów przyczyniających się do powstawania tromboembolizmu płucnego (niedrożność naczyń krwionośnych spowodowana skrzeplinami) obserwowanego w patogenezie astmy. Wyniki badań na pacjentach z astmą, nie

zostały włączone do opisywanego zadania badawczego, ale stanowią potwierdzenie o praktycznym znaczeniu wpływu reaktywnych form tlenu i azotu na retrakcję skrzepu w warunkach fizjologicznych.

Ważnym czynnikiem determinującym kinetykę retrakcji skrzepu jest liczba elementów morfotycznych krwi. W trakcie badań na pacjentach z czerwienicą prawdziwą (*polycythemia vera*), gdzie obserwuje się nadprodukcję wszystkich elementów morfotycznych krwi wykorzystano tromboelastografię (praca nr 4: „*Evaluation of hemostatic balance in blood from patients with polycythemia vera by means of thromboelastography: The effect of isovolemic erythrocytapheresis*”. *Platelets* 2012; 23(6):455-462). Technika ta, w przeciwieństwie do innych metod pomiaru koagulacji przeprowadzanych w osoczu, pozwala na pomiar we krwi pełnej oraz dostarcza informacji o udziale w powstawaniu skrzepu, nie tylko osoczowych czynników krzepnięcia, ale także i elementów morfotycznych krwi. Dostarcza również informacji o jakości utworzonego skrzepu, jego stabilizacji i fibrylizacji w czasie rzeczywistym (24). Badania przeprowadzone na znacznej grupie chorych (n=76) i osób zdrowych (n=50) wykazały, zwiększoną skłonność do nadkrzepliwości - zwłaszcza u pacjentów z wyraźnie podwyższoną liczbą płytek krwi. Większa liczba płytek krwi przekłada się na zwiększoną produkcję trombiny, na powierzchni aktywowanych krwinek, co przekłada się na wzrost szybkości powstawania skrzepu i jego większego usieciowania (4, 5, 25). Niewykluczone, że również erytrocyty mogą odgrywać istotną rolę w zwiększonej generacji trombiny (26). W podjętych badaniach podjąłem więc próbę określenia czy redukcja hematokrytu (zmniejszenie liczby krwinek czerwonych) wpływa na ograniczenie stanu nadkrzepliwości w tej grupie chorych. Wbrew oczekiwaniom erytroafereza (usunięcie części erytrocytów) przyczyniła się do jeszcze szybszego powstawania skrzepów o zwiększonej amplitudzie (nasilonej sile spójności), co dodatkowo pogłębiało już istniejący stan nadkrzepliwości. Dodatkowe badania na krwi osób zdrowych wykazały, że 10-20 % rozcieńczenie krwi za pomocą soli fizjologicznej (hemodylucja) także powoduje wzrost krzepliwości krwi (zwiększonej generacji trombiny) (25). Skrzepy powstające w obecności wyższych stężeń trombiny, utworzone są z cienkich włókien fibryny dość gęsto usieciowanych. Natomiast niższe stężenia trombiny sprzyjają powstawaniu włókien o większej średnicy (18), przez co utworzony skrzep posiada w swej strukturze większe pory (przez co jego struktura jest bardziej luźna), co potencjalnie ułatwia dyfuzję czynników

fibrynolitycznych do wnętrza takiego skrzepu. W kolejnej pracy z omawianego cyklu wykazano, że istotnie u chorych na czerwienicę (n=48) powstają skrzepy charakteryzujące się znacznie bardziej rozbudowaną strukturą/architekturą niż u osób zdrowych (praca nr 5: „*Platelet-related fibrinolysis resistance in patients suffering from PV. Impact of clot retraction and isovolemic erythrocytapheresis*”. *Thromb. Res.* 2014; 134(1): 192-198). Co interesujące, objętość tak powstałych skrzepów po 40 minutach od inicjacji krzepnięcia była znacznie mniejsza, a szybkość retrakcji była wyraźnie większa u pacjentów z czerwienicą w porównaniu do osób zdrowych (27). Wynikać to może z zwiększonej liczby elementów morfotycznych u tych pacjentów. Płytki krwi odpowiadają bowiem za zdolność skrzepu do zmniejszenia jego objętości. Prowadzone w tym okresie przez mnie badania wykazały, że wraz z wzrostem liczby płytek krwi skrzepy są szybciej obkurczane, gdyż wzrasta wtedy płytkowa siła kurczliwości. Ponieważ erytrocyty nie posiadają aktomiozyny (28) ich rola w retrakcji skrzepu jest ograniczona. Jednak znacząca ilość takich komórek uwięzionych w strukturze skrzepu mogłaby wpływać na zdolność do jego obkurczenia. Aby ustalić rolę erytrocytów w procesie retrakcji postanowiono wykorzystać fakt, że w terapii czerwienicy prowadzi się erytroaferezę (automatyczną separację i usunięcie krwinek czerwonych). Pacjentom po usunięciu erytrocytów podaje się sól fizjologiczną, co prowadzi do znormalizowania hematokrytu i ciśnienia tętniczego (29). Wykazano jednak, że zabieg ten był mało efektywny w normalizacji przyspieszonej retrakcji. Potwierdziło to zatem, że proces obkurczania skrzepu jest silnie zależny od krwinek płytkowych, gdyż ich liczba nie ulegała istotnej zmianie w wyniku erytroaferezy (27).

Skrzepy, które ulegały znacznie szybszej retrakcji okazały się być mniej podatne (bardziej odporne) na fibrynolizę. Mogło to wynikać zarówno z nasilenia krzepnięcia, jak i z obecności wyższych stężeń inhibitorów fibrynolizy w tej grupie chorych. W tym celu przeprowadzono dodatkowe badania z wykorzystaniem czynnika tkankowego (TF, ang. *Tissue Factor*). Wykazano, że wraz z wzrostem stężenia TF we krwi (a tym samym i większej ilości wygenerowanej trombiny) obserwuje się wzrost szybkości retrakcji, przy jednoczesnym ograniczeniu fibrynolizy (27). Wyniki te jednoznacznie potwierdzają, że retrakcja jest zjawiskiem warunkującym czas utrzymywania się skrzepu w świetle naczynia krwionośnego. Ogranicza ona bowiem dostęp czynników fibrynolitycznych do skrzepu, a tym samym obkurczone skrzepy są mniej podatne na rozpuszczanie. Powstający stan nadkrzepliwości

wynika zatem nie tylko z nasilenia/przyspieszenia krzepnięcia, ale może być także konsekwencją dłuższego utrzymywania się skrzepów w świetle naczynia krwionośnego. Badania przeprowadzone w tej pracy wskazują, że ograniczenie aktywacji płytek przez zastosowania leków blokujących receptory GPIIb/IIIa ogranicza nasiloną retrakcję oraz przyspiesza fibrylizację. Powszechnie stosowana aspiryna jako lek ograniczający aktywację płytek, okazała się mało efektywna zarówno w normalizacji nasilonego krzepnięcia (25), jak i retrakcji skrzepu (27). Obecnie prowadzone są dalsze badania dotyczące zaburzonej retrakcji u pacjentów z chorobami mieloproliferacyjnymi, z szczególnym uwzględnieniem interakcji pomiędzy płytkami krwi i leukocytami (rola kompleksów leukocytarno-płytkowych w powstawaniu i stabilizacji skrzepów), oraz pojawianiem się mediatorów odpowiedzi zapalnej. Uwzględnienie tych oddziaływań może pozwolić na lepsze zrozumienie mechanizmów regulujących proces retrakcji w warunkach fizjologicznych, a także przyczynić się do opracowania nowych metod zapobiegania powstawaniu incydentom zakrzepowym.

Ważny obszar moich zainteresowań naukowych stanowią również zagadnienia związane z wpływem wielkości płytek krwi na ich reaktywność, w tym kinetykę procesu krzepnięcia i retrakcji. W pracy nr 6, z przedstawionego cyklu („*Involvement of hyperglycemia in the development of platelet procoagulant response: the role of aldose reductase and platelet swelling*”. *Blood Coagul Fibrinol* 2017;28(6):443-451) wykazano, że w wyniku zwiększenia stężenia glukozy (>10 mM glukozy) we krwi (hiperglikemia), może dochodzić do wzrostu objętości krwinek płytkowych, a tym samym zwiększenia ich reaktywności. Przyczyną tego zjawiska może być obecna w płytkach reduktaza aldozowa, która doprowadzając do wewnątrzpłytkowej akumulacji sorbitolu wzmaga polimeryzację tubuliny (30). W nieaktywowanych płytkach krwi zlokalizowane obwodowo wiązki mikrotubuli odpowiadają za utrzymanie ich dyskooidalnego kształtu (1, 31, 32). W wyniku aktywacji tych komórek dochodzi do reorganizacji cytoszkieletu, co doprowadza do rozpadu wiązek mikrotubuli i zmiany kształtu komórki na kulisty z licznymi wypustkami. Tworzenie wypustek możliwe jest dzięki wzmożonej polimeryzacji tubuliny, gdy kolejne podjednostki dobudowywane są do istniejących mikrotubuli. Z danych literaturowych wynika, że w aktywowanych płytkach ilość spolimeryzowanej tubuliny wzrasta ponad trzykrotnie, a jej ilość w płytkach olbrzymich jest znacznie podwyższona (31, 32). W swoich badaniach wykazałem, że hiperglikemia nasilała proces polimeryzacji tubuliny, a po kilkugodzinnej

ekspozycji płytek na wysokie stężenia glukozy dochodziło do wzrostu ich objętości (MPV – *mean platelet volume*). Dotychczas uważano, że podwyższone wartości MPV w cukrzycy wynikały raczej z krótszego czasu życia płytek i wzmożonej trombopojezy (33). Młode płytki krwi charakteryzują się bowiem znacznie większą objętością, a wraz z upływem czasu zmniejszają swoją objętość. Badania przeprowadzone pod moim kierunkiem sugerują, że również przewlekła hiperglikemia może przyczyniać się do zwiększenia objętości płytek. W takich warunkach krwinki płytkowe ulegają znacznie łatwiejszej aktywacji, nawet w obecności niższych stężeń fizjologicznych aktywatorów. Może to skutkować zaburzeniami hemostazy, co jest widoczne u osób z cukrzycą, gdzie obserwuje się nasilenie krzepnięcia i upośledzenie fibrynolizy. W swoich badaniach wykazałem, że sztucznie wywołana hiperglikemia przyczynia się do powstawania stanu nadkrzepliwości. W obecności podwyższonych stężeń glukozy (10-50 mM) powstają skrzepy o znacznie bardziej rozbudowanej strukturze/elastyczności, które znacznie wolniej się obkurczają. Co interesujące zastosowanie inhibitorów reduktazy aldozowej, bądź winkrystyny (związku wiążącego się z tubuliną, który powoduje destabilizację mikrotubuli) ograniczało prokoagulacyjne działanie glukozy, jak i wzrost objętości krwinek płytkowych w warunkach hiperglikemii (30). Może to stanowić podstawę do opracowania nowej strategii leczenia i zapobiegania incydentom zakrzepowym w hiperglikemii, jednak wymagane są dalsze badania celem ustalenia dokładnych mechanizmów kontrolujących te zjawiska.

W marcu 2017 w współpracy z Kliniką Endokrynologii UMB zostały podjęte badania na pacjentach z cukrzycą (pacjenci z hiperglikemią, jak i normoglikemią), gdzie skupiamy się na ocenie kinetyki retrakcji skrzepu. Wstępne wyniki wskazują, że u osób z hiperglikemią i podwyższonymi parametrami MPV, objętość powstałych skrzepów po 40 minutach jest znacznie większa niż u osób zdrowych, a proces retrakcji jest wyraźnie spowolniony. Badania eksperymentalne przeprowadzone na izolowanych płytkach krwi wykazały, że w wyniku wzrostu ich objętości o 10% (m. in. indukowane hiperglikemią, aktywacją wymienniczą Na^+/H^+) obserwuje się zmniejszoną szybkość retrakcji i większą amplitudę (siłę) utworzonych skrzepów w porównaniu do preparatów kontrolnych. Sugeruje to, że kinetyka procesu retrakcji zależy nie tylko od liczby płytek, ale także i od wielkości tych komórek. Podjęte badania pozwolą ustalić, czy istnieje zależność pomiędzy zwiększoną objętością krwinek płytkowych, a ich nasiloną aktywacją i zmniejszoną podatnością skrzepów na obkurczanie.

Pozwoli to też na lepsze zrozumienie mechanizmów działania wysokich stężeń glukozy na powstawanie zaburzeń hemostazy, obserwowanych u pacjentów z cukrzycą.

Piśmiennictwo:

- [1]. White JG. Platelet structure [in] Platelets. Second edition. Michelson AD (ed.). Elsevier Academic Press; San Diego 2007. pp. 45-73.
- [2]. Gale AJ. Current Understanding of Hemostasis. *Toxicol Pathol.* 2011; 39: 273–280.
- [3]. Heemskerk JW, Bevers EM, Lindhout T. Platelet activation and blood coagulation. *Thromb Haemost.* 2002; 88:186-93.
- [4]. de Witt SM, Verdoold R, Cosemans JM, Heemskerk JW. Insights into platelet-based control of coagulation. *Thromb Res* 2014; 133: S139–48.
- [5]. Rosing J, Tans G, Govers-Riemslog JW, Zwaal RF, Hemker HC. The role of phospholipids and factor Va in the prothrombinase complex. *J Biol Chem.* 1980; 255(1):274-83.
- [6]. Lentz BR. Exposure of platelet membrane phosphatidylserine regulates blood coagulation. *Prog Lipid Res.* 2003; 42(5):423-38.
- [7]. Tucker KL, Sage T, Gibbins JM. Clot retraction. *Methods Mol Biol* 2012; 788:101–7.
- [8]. Ono A, Westein E, Hsiao S, Nesbitt WS, Hamilton JR, Schoenwaelder SM, Jackson SP. Identification of a fibrin-independent platelet contractile mechanism regulating primary hemostasis and thrombus growth. *Blood* 2008; 112:90–9.
- [9]. Brass LF, Diamond SL. Transport physics and biorheology in the setting of hemostasis and thrombosis. *J Thromb Haemost.* 2016; 14, 906–17.
- [10]. Hewson W. *Experimental Inquiry Into the Properties of the Blood: with remarks on some of its morbid appearances: and an appendix relating to the discovery of the lymphatic system in birds, fish, and the animals called amphibious.* London, Printed for T. Cadell 1772.
- [11]. Levi M, van der Poll T. Inflammation and coagulation. *Crit Care Med.* 2010;38(2 Suppl):S26-34.
- [12]. Ray PD, Huang PW, Tsuji Y. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cell Signal* 2012; 24:981-90.
- [13]. Mohiuddin I, Chai H, Lin PH, Lumsden AB, Yao Q, Chen C. Nitrotyrosine and chlorotyrosine: clinical significance and biological functions in the vascular system. *J Surg Res* 2006; 133:143–9.
- [14]. Misztal T, Rusak T, Tomasiak M. Peroxynitrite may affect clot retraction in human blood through the inhibition of platelet mitochondrial energy production. *Thromb Res* 2014; 133: 402-11.
- [15]. Rusak T, Tomasiak M, Ciborowski M. Peroxynitrite can affect platelet responses by inhibiting energy production. *Acta Biochim Pol* 2006; 53:769-76.
- [16]. Mürer EH. Clot retraction and energy metabolism of platelets. Effect and mechanism of inhibitors, *Biochim. Biophys. Acta* 1969; 172:266–76.
- [17]. Misztal T, Rusak T, Brańska-Januszewska J, Ostrowska H, Tomasiak M. Peroxynitrite may affect fibrinolysis via the reduction of platelet-related fibrinolysis resistance and alteration of clot structure. *Free Rad Biol Med.* 2015; 89:533-47.
- [18]. Wolberg AS. Thrombin generation and fibrin clot structure. *Blood Rev.* 2007; 21(3):131-42.
- [19]. Winterbourn CC. Biological reactivity and biomarkers of the neutrophil oxidant, hypochlorous acid. *Toxicology.* 2002; 181-182:223-7
- [20]. Misztal T, Rusak T, Tomasiak M. Clinically relevant HOCl concentrations reduce clot retraction rate via the inhibition of energy production in platelet mitochondria. *Free Rad Res* 2014; 48: 1443-53.
- [21]. Zuo L, Koozechian MS, Chen LL. Characterization of reactive nitrogen species in allergic asthma. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2014; 112:18–22.
- [22]. Tomasiak-Łozowska MM, Rusak T, Misztal T, Bodzenta-Lukaszyk A, Tomasiak M. Reduced clot retraction rate and altered platelet energy production in patients with asthma. *Journal of Asthma.* 2016; 53: 589-98.
- [23]. Tomasiak-Łozowska MM, Misztal R, Rusak T, Brańska-Januszewska J, Bodzenta-Łukaszyk A, Tomasiak M. Asthma is associated with reduced fibrinolytic activity, abnormal clot architecture, and decreased clot retraction rate. *Allergy* 2017; 72:314-9.

- [24]. Spiel AO, Mayr FB, Firbas C, Quehenberger P, Jilma B. Validation of rotation thrombelastography in a model of systemic activation of fibrinolysis and coagulation in humans. *J Thromb Haemost* 2006; 4: 411–6.
- [25]. Rusak T, Ciborowski M, Uchimiak-Owieczko A, Piszcz J, Radziwon P, Tomasiak M. Evaluation of hemostatic balance in blood from patients with polycythemia vera by means of thromboelastography: The effect of isovolemic erythrocytapheresis. *Platelets* 2012; 23: 455-62.
- [26]. Whelihan MF, Zachary V, Orfeo T, Kenneth G, Mann KG. Prothrombin activation in blood coagulation: the erythrocyte contribution to thrombin generation. *Blood*. 2012;120(18): 3837–45.
- [27]. Rusak T, Piszcz J, Misztal T, Brańska-Januszewska J, Tomasiak M. Platelet-related fibrinolysis resistance in patients suffering from PV. Impact of clot retraction and isovolemic erythrocytapheresis. *Thromb Res* 2014; 134: 192-8
- [28]. Li J, Lykotrafitis G, Suresh S. Cytoskeletal dynamics of human erythrocyte. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2007; 104:4937–42.
- [29]. Rusak T, Misztal T, Piszcz J, Tomasiak M. Nitric oxide scavenging by cell-free hemoglobin may be a primary factor determining hypertension in polycythemic patients. *Free Rad Res* 2014; 48: 230-8.
- [30]. Rusak T, Misztal T, Rusak M, Branska-Januszewska J, Tomasiak M. Involvement of hyperglycemia in the development of platelet procoagulant response: the role of aldose reductase and platelet swelling. *Blood Coagul Fibrin*, 2017, 28:443-51.
- [31]. White JG, Rao GH. Microtubule coils versus the surface membrane cytoskeleton in maintenance and restoration of platelet discoid shape. *Am J Pathol*. 1998; 152(2): 597–609.
- [32]. Patel-Hett S, Richardson JL, Schulze H, Drabek K, Isaac NA, Hoffmeister K, Shivdasani RA, Bulinski JC, Galjart N, Hartwig JH, Italiano JE Jr. Visualization of microtubule growth in living platelets reveals a dynamic marginal band with multiple microtubules. *Blood*. 2008; 111:4605-16.
- [33]. Tschöpe D, Langer E, Schauseil S, Rösen P, Kaufmann L, Gries FA. Increased platelet volume--sign of impaired thrombopoiesis in diabetes mellitus. *Klin Wochenschr*. 1989; 67:253-9.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo – badawczych.

A. Dane bibliometryczne.

Jestem autorem 21 publikacji naukowych (prac oryginalnych, w tym 11 prac jako 1 lub 2 autor). Ponadto jestem współautorem 25 krajowych i zagranicznych doniesień zjazdowych, których streszczenia zostały opublikowane w czasopismach lub materiałach zjazdowych.

Łączny dorobek naukowy wynosi:

- Impact factor IF: **49,003**
- Punkty wg MNiSW: **469**
- Indeks Hirscha wg Web of Science: **7**
- Liczba cytowań wg Web of Science: **110**

B. Tematyka prac badawczych (nie wchodzących w skład osiągnięcia wymienionego w punkcie 4).

Od początku swojej kariery zawodowej związany jestem z Zakładem Chemii Fizycznej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku. Mój dorobek przed uzyskaniem doktoratu obejmuje 2 prace doświadczalne oraz 7 doniesień zjazdowych prezentowanych na

zjazdach i konferencjach naukowych. Ważnym obszarem moich badań w tym okresie były zagadnienia związane z wpływem nadtlenuazotynu (ONOO^-) na płytki krwi, który w układach biologicznych powstaje w wyniku spontanicznej reakcji tlenku azotu (NO^\bullet) i anionorodnika ponadtlenkowego ($\text{O}_2^{\bullet-}$). Ponieważ w ostrych i przewlekłych stanach zapalnych często dochodzi do powstawania ONOO^- , przyjmuje się, że jest on jednym z głównych czynników stresu oksydacyjnego, powstającym w układzie krążenia. W początkowym okresie pracy zająłem się opracowywaniem metody syntezy nadtlenuazotynu, która pozwoliła na uzyskanie preparatu o finalnym stężeniu ($> 200 \text{ mM}$) – znacznie wyższym niż komercyjnie dostępne produkty. Wykorzystanie otrzymanego związku pozwoliło na przeprowadzenie szeregu eksperymentów dotyczących wpływu tego związku na płytki krwi i układ krzepnięcia. Wynikiem ich była rozprawa doktorska oraz prace doświadczalne i doniesienia zjazdowe (powstałe także i w latach następnych, po uzyskaniu stopnia doktora nauk medycznych). Wykazano, że ONOO^- , jako niezwykle reaktywna cząsteczka, wpływał na wiele funkcji płytek krwi, przy czym jego działanie było uzależnione od środowiska, w którym zawieszono były badane komórki [rozprawa doktorska, A3]. Z jednej strony związek ten hamował agregację płytek, sekrecję substancji wewnątrzpłytkowych z ziarnistości, aktywność prokoagulacyjną wywoływaną naturalnymi stymulatorami (np. kolagenem), czy powodował zaburzenia w procesie produkcji energii w mitochondriach płytkowych. Zahamowanie oddychania mitochondrialnego przy użyciu brokerów transportu elektronów w łańcuchu oddechowym, powoduje stymulację procesu glikolizy. Zjawisko, to znane jako efekt Paustera, świadczy o powiązaniu funkcjonalnym oddychania mitochondrialnego i glikolizy w płytkach. Istotnie wykazano, że ONOO^- w sposób zależny od stężenia hamuje zużywanie tlenu, a także spadek aktywności oksydazy cytochromowej i reduktazy NADH-ubichinon. Zwiększona stymulacja glikolizy, przez ten związek nie było w stanie zrekompensować ubytku ATP normalnie produkowanego w mitochondriach, co prowadziło do hamowania odpowiedzi płytkowych. Z drugiej strony był on także w stanie wywoływać aktywację tych płytek krwi, zwłaszcza jeśli komórki te były zawieszono w środowisku sztucznym, pozbawionym naturalnych antyoksydantów. Wykazałem, że ONOO^- oprócz inicjowania agregacji płytek, może także powodować powstawanie sygnału wapniowego w tych komórkach (napływ jonów wapnia, który powoduje aktywację płytek poprzez oddziaływanie na wiele białek efektorowych), czy doprowadzać do ekspresji P-selektyny na powierzchni płytek, która uważana jest jako miernik aktywacji płytek w badaniach z użyciem cytometrii przepływowej. W trakcie wspomnianych

badania opracowałem i zoptymalizowałem szereg technik badawczych (m.in. oznaczanie wewnątrzkomórkowego stężenia jonów wapniowych i pH z wykorzystaniem znaczników fluorescencyjnych, pobór tlenu przez zawiesinę komórek za pomocą elektrody Clarka, oznaczanie aktywności enzymów mitochondrialnego łańcucha oddechowego, pomiar szybkości glikolizy metodą enzymatyczną i z wykorzystaniem pH-statu) wykorzystywanych do chwili obecnej w pracach badawczych realizowanych w Zakładzie Chemii Fizycznej UMB. Metoda uzyskiwania nadtlenoazotynu wykorzystywana była przez cały okres mojej pracy, co pozwoliło mi w okresie późniejszym przeprowadzić jeszcze wiele eksperymentów, w tym także dotyczących wpływu ONOO^- na proces stabilizacji powstałego skrzepu, jego obkurczania i fibrylizacji, o czym jest mowa w części dotyczącej osiągnięcia naukowego.

W tym okresie uczestniczyłem także w pracach zespołu określającego wpływ tlenu azotu i jego donorów na funkcje płytek krwi. Wykazano, że donory tlenu azotu były w stanie hamować odpowiedzi płytek krwi, w tym agregację płytek i sekrecję z ziarnistości. W stężeniach, w których donory NO ograniczały uwalnianie substancji zmagazynowanych w ziarnistościach płytkowych, hamowały także pobór tlenu przez płytki krwi i aktywność oksydazy cytochromowej. Sugeruje to, że proces sekrecji jest silnie zależny od mitochondrialnej produkcji energii i może być ograniczany przez NO, zwłaszcza na etapie oksydazy cytochromowej [A2].

Zarówno przed doktoratem, jak i w okresie późniejszym brałem udział w innych pracach badawczych realizowanych w Zakładzie Chemii Fizycznej UMB. Wiele uwagi poświęciłem badaniom, w których wykazano zależność pomiędzy zwiększoną ilością jonów sodowych (Na^+) w cytosolu płytek, a aktywnością prokoagulacyjną płytek. Prowadzone przez szereg lat badania wykazały, że napływowi jonów Na^+ do wnętrza płytki towarzyszy napływ wody z środowiska i wzrost objętości komórki. Wykazano, że wzrost aktywacji wymiennicza Na^+/H^+ (NHE) jest w stanie przyczynić się do wywołania odpowiedzi prokoagulacyjnej płytek krwi. Aktywacji NHE towarzyszy powstawanie wykazujących działanie prokoagulacyjne - mikropęcherzyków (microvesicles) płytkowych, dlatego też zastosowanie inhibitorów wymiennicza Na^+/H^+ lub eliminacja jonów sodu z środowiska, w którym zawieszono płytki doprowadza do zmniejszenia ilości powstających mikropęcherzyków [A1] i ograniczenia odpowiedzi prokoagulacyjnej [A1, B1, B5]. Nasilenie odpowiedzi prokoagulacyjnej płytek osiągnięto poprzez zablokowanie Na^+/K^+ -ATPazy, co może mieć istotne znaczenie praktyczne, gdyż stosowane w farmakoterapii leki ouabainopodobne są inhibitorami pompy sodowo-potasowej. Wykazano, że zarówno proscylarydyna, oubaina, jak

i digoksyna, w sposób zależny od stężenia i czasu działania, powodują napływ jonów Na^+ do cytosolu płytek, co skutkuje wzrostem objętości tych komórek i zwiększoną ekspresją fosfatydyloseryny na ich powierzchni [B1, B2]. Doprowadza to do nasilenia odpowiedzi prokoagulacyjnej, która jest silnie hamowana w przypadku braku jonów sodowych w środowisku, w którym zawieszono płytki lub zwiększenia osmolarności tego medium. Przeprowadzone badania sugerują, że długotrwała terapia inhibitorami pompy sodowo-potasowej może przyczyniać się do powstawania stanu nadkrzepliwości u pacjentów przyjmujących tego typu leki.

Kolejny nurt badań odnosi się do interakcji wielu leków z płytkami krwi. Oprócz wspomnianych wcześniej glikozydów nasercowych wykazano, że także inne leki w wyniku interakcji z płytkami krwi mogą przyczyniać się do nasilenia odpowiedzi prokoagulacyjnej. Działanie takie wykazują m.in.: cyklosporyna – hydrofobowy lek o silnych właściwościach immunosupresyjnych [B3] oraz chlorpromazyna – lek o działaniu przeciwpsychotycznym, które akumulując się w dwuwarstwie fosfolipidowej przyczyniają się do utraty asymetrii błony. W nieaktywowanych płytkach, wykazująca prokoagulacyjne właściwości fosfatydyloseryna, zlokalizowana jest głównie w wewnętrznej części dwuwarstwy, a dopiero po aktywacji płytek dochodzi do jej ekspresji na powierzchni komórek. Leki te akumulując się w błonie doprowadzają do zaburzenia w rozmieszczeniu fosfolipidów, co może przyczyniać się do wywołania odpowiedzi prokoagulacyjnej płytek lub nasilać działanie fizjologicznych stymulatorów płytek. W nasilaniu odpowiedzi prokoagulacyjnej przez takie leki jak wazopresyna [B5], czy adrenalinę kluczową rolę przypisano aktywacji wymiennicza Na^+/H^+ . Badania, z wykorzystaniem EIPA czy genisteiny wykazały, że nasiloną odpowiedź prokoagulacyjną płytek wywoływane przez te leki była wyraźnie hamowane. Celem zapobieganiu przykrym konsekwencjom nadkrzepliwości realizowano także badania lekami hamującymi funkcje płytek. Wykazano, że tirofiban blokujący płytkowe receptory GPIIb/IIIa może przyczyniać się do ograniczania odpowiedzi płytek (agregacja, sekrecja) indukowanych przez słabe aktywatory, jak ADP. Jednak w przypadku trombiny okazał się on słabym inhibitorem odpowiedzi prokoagulacyjnej, co zmniejsza potencjalną użyteczność tego leku w ograniczaniu stanu nadkrzepliwości [B4]. Obiecujące wyniki uzyskano natomiast prowadząc badania z substancjami, które wykazują inhibicyjne działanie w stosunku do akwaporyn (kanałów błonowych uczestniczących w transporcie wody). Niewykluczone, że zablokowanie napływu wody do cytosolu płytek może stanowić kluczowy czynnik w ograniczeniu nadmiernej aktywacji płytek i stanowić będzie nową strategię zapobiegania powstawaniu

incydentem zakrzepowym u osób z nadkrzepliwością. Badania dotyczące roli akwaporyn w aktywacji płytek nadal są przedmiotem mojego zainteresowania i wnioski z tych doświadczeń w niedługim czasie zostaną opublikowane.

W wyniku nawiązaniu współpracy z innymi jednostkami podjęto szereg badań dotyczących zaburzeń hemostazy, czy funkcji płytek. U pacjentów z astmą obserwuje się wyraźnie spowolnioną retrakcję, w porównaniu do osób zdrowych, co może wynikać z podwyższonego stężenie NO w płucach (FE_{NO}). Wykazano, że glikokortkosteroidy stosowane w leczeniu astmy obniżają stężenie tlenu azotu w wydychanym powietrzu, jednak nie wpływa to istotnie na różnice w kinetyce retrakcji, pomiędzy pacjentami leczonymi i nieleczonymi [B7]. Niewykluczone, że różnice w kinetyce retrakcji pomiędzy pacjentami z astmą, a zdrowymi ochotnikami wynikają z upośledzenia produkcji energii w mitochondriach płytkowych. Dodatkowo u takich pacjentów oprócz spowolnionej retrakcji obserwuje się też wyraźnie zahamowaną fibrylizę. Przeprowadzone badania wykazały, że skrzepy powstające we krwi/osoczu pochodzącej od pacjentów z astmą mają znacznie bardziej usieciowaną strukturę. Zwiększone stężenie czynnika XIII, stabilizującego fibrynę oraz podwyższony poziom inhibitora tkankowego aktywatora plazminogenu typu I (PAI-1) powodują, że tak powstałe skrzepy są bardziej odporne na działanie czynników fibrynolitycznych [B9]. Spowolniona retrakcja i fibrynoliza mogą przyczyniać się do dłuższego okresu utrzymywania się wytworzonego skrzepu w świetle naczynia krwionośnego, co w konsekwencji przyczynia się do dłuższego okresu niedotlenienia tkanek. W porównaniu do osób zdrowych, czas niezbędny do obkurczenia skrzepu o połowę jest niemal dwukrotnie dłuższy u osób z astmą, co może sprzyjać zwiększonemu ryzyku zatorowości płucnej w tej grupie chorych. Co interesujące przeprowadzone badania nie wykazały istotnych różnic w liczbie i reaktywności płytek, ilości fibrynogenu czy zdolności do wytworzenia skrzepu pomiędzy chorymi na astmę, a zdrowymi ochotnikami [B7, B9].

W ramach badań u pacjentów z czerwienicą prawdziwą, wykazano kluczową rolę wolnej hemoglobiny (uwalnianej z uszkodzonych erytrocytów) w obniżeniu ilości tlenu azotu w świetle naczyń krwionośnych. Ponieważ NO powoduje rozkurcz naczyń krwionośnych, to jego ograniczona produkcja wraz z zwiększoną ilością elementów morfotycznych krwi predysponuje osoby z czerwienicą do nadciśnienia tętniczego, które często występuje w tej grupie chorych [C1].



Ze względu na różne etapy pracy naukowej, dotychczasowe publikacje można pogrupować następująco:

A. Prace przed uzyskaniem stopnia doktora (dotyczące roli jonów sodu w aktywacji płytek oraz wpływu tlenu azotu i nadtlenoazotynu na metabolizm energetyczny:

A1. Stelmach H, Rusak T, Tomasiak M. The involvement of the Na⁺/H⁺ exchanger in the formation of microvesicles by porcine platelets. *Haematologica* 2002; 32:239-252

A2. Tomasiak M, Stelmach H, Rusak T, Wysocka J. Nitric oxide and platelet energy metabolism. *Acta Biochimica Polonica*. 2004; 51:789-803

A3. Rusak T, Tomasiak M, Ciborowski M. Peroxynitrite can affect platelet responses by inhibiting energy production. *Acta Biochimica Polonica* 2006; 53: 769-776.

B. Prace dotyczące badań nad odpowiedzią prokoagulacyjną płytek, kinetyką powstawania skrzepu i retrakcji (po uzyskaniu doktoratu)

B1. Winnicka K, Stelmach H, Rusak T, Tomasiak M, The in vitro effect of proscillaridin on platelet responses. *Acta Poloniae Pharmaceutica Drug Research* 2005; 62: 319-325

B2. Tomasiak M, Stelmach H, Rusak T, Ciborowski M, Radziwon P. The involvement of Na⁺/K⁺-ATPase in the development of platelet procoagulant response. *Acta Biochimica Polonica* 2007; 54: 625-639

B3. Tomasiak M, Rusak T, Gacko M, Stelmach H. Cyclosporine enhances platelet procoagulant activity. *Nephrology Dialysis Transplantation* 2007; 22: 1750-1756.

B4. Ciborowski M, Tomasiak M, Rusak T, Winnicka K, Dobrzycki S. The in-vitro effect of tirofiban, glycoprotein IIb/IIIa antagonist, on various responses of porcine blood platelets. *Blood Coagulation & Fibrinolysis* 2008; 19: 557-567.

B5. Tomasiak M, Stelmach H, Rusak T, Ciborowski M, Radziwon P. Vasopressin acts on platelets to generate procoagulant activity. *Blood Coagulation & Fibrinolysis*, 2008; 19: 615-624.

B6. Misztal T, Przesław K, Rusak T, Tomasiak M. Peroxynitrite - altered platelet mitochondria - A new link between inflammation and hemostasis. *Thrombosis Research* 2013; 13: e17-25

B7. Tomasiak-Lozowska MM, Rusak T, Misztal T, Bodzenta-Lukaszyk A, Tomasiak M. Reduced clot retraction rate and altered platelet energy production in patients with asthma. *Journal of Asthma*. 2016; 53(6):589-598.

B8. Rogowska A, Chabowska AM, Lipska A, Boczkowska-Radziwon B, Bujno M, Rusak T, Dziemianczuk M, Radziwon P. High-frequency (13.56-MHz) and ultrahigh-frequency (915-MHz) radio identification systems do not affect platelet activation and functions. *Transfusion*. 2016; 56:1148-1152.

B9. Tomasiak-Łozowska MM, Misztal R, Rusak T, Brańska-Januszewska J, Bodzenta-Łukaszyk A, Tomasiak M. Asthma is associated with reduced fibrinolytic activity, abnormal clot architecture, and decreased clot retraction rate. *Allergy* 2017; 72:314-319

C. pozostałe prace:

C1. Rusak T, Misztal T, Piszcz J, Tomasiak M. Nitric oxide scavenging by cell-free hemoglobin may be a primary factor determining hypertension in polycythemic patients. Free Radical Research 2014; 48: 230-238.

C2. Purwin M, Markowska A, Bruzgo I, Rusak T, Surazyński A, Jaworowska U, Midura-Nowaczek K. Peptides with 6-aminohexanoic acid: synthesis and evaluation as plasmin inhibitors. International Journal of Peptide Research and Therapeutics. 2017, 23: 235-245.

A handwritten signature in blue ink that reads "Tomasz Rusak". The signature is written in a cursive style with a large initial 'T' and 'R'.