



Zakład Medycznej Diagnostyki Laboratoryjnej
Katedra Analityki Klinicznej
ul. Dębinki 7, 80-210 Gdańsk
Tel. sekretariat +58 349-2782 lub -1182
Tel. + 58 349-2791
Kierownik: Prof. dr hab. n. med. Leszek Kalinowski
E-mail: leszek.kalinowski@gumed.edu.pl

Gdańsk, 08.06.2021 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej
mgr Joanny Mikłosz
pt. „Małopłytkowość indukowana protaminą oraz jej potencjalne powikłania
zakrzepowo-zatorowe w eksperymentalnych modelach zwierzęcych”

Małopłytkowość polekowa należy do aktualnych zagadnień w dziedzinie farmakologii doświadczalnej i klinicznej. W ramach przedstawionej do recenzji rozprawy doktorskiej zostało poddane szczegółowej ocenie nowe zaburzenie immunoematologiczne określane jako małopłytkowość indukowana protaminą. Protamina pozostaje jedynym, stosowanym od lat lekiem odwracającym aktywność heparyny niefrakcjonowanej, której podanie obarczone jest ryzykiem wystąpienia wielu reakcji niepożądanych. Z kolei heparyna jako antykoagulant wykorzystywana jest w leczeniu zakrzepicy żyłnej, zatorowości płucnej, niestabilnej dławicy piersiowej, świeżego zawału serca, podczas operacji z użyciem krążenia pozaustrojowego, angioplastyki tętnic wieńcowych, u chorych z wszczepionymi stentami, z rozsianym krzepnięciem śródnaczyniowym i dializowanych. Biorąc pod uwagę rosnącą liczbę interwencji kardiochirurgicznych na świecie, w tym także w Polsce, bezpieczne zatrzymanie działania heparyny podczas zagrażającego życiu krwawienia staje się coraz bardziej pożądanym celem.

Rozprawa doktorska dotyczy interesującej kwestii jaką jest wpływ protaminy w połączeniu z heparyną na aktywację płytek krwi prowadzącą do małopłytkowości. Dotychczasowy stan wiedzy na temat opisywanego powyżej zjawiska opierał się jedynie na kilku przypadkach klinicznych. Nadal brakuje danych potwierdzających wskaźnik i skalę małopłytkowości indukowanej protaminą. Uzasadnionym wydaje się zatem zbadanie tego zjawiska przez Panią mgr Joannę Mikłosz z wykorzystaniem eksperymentalnych modeli zwierzęcych. W rozprawie doktorskiej opisano wyniki badań dotyczących wpływu protaminy i jej kompleksów z heparyną na liczbę i funkcję płytek krwi, proces megakariocytopoezy oraz rozwój zakrzepicy tętniczej i parametry koagulologiczne. Praca została wykonana pod opieką Pana dr hab. Andrzeja Mogielnickiego - Adiunkta Zakładu Farmakodynamiki Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku, który dysponuje istotnym doświadczeniem naukowym i stosowną infrastrukturą badawczą dla prowadzenia badań farmakologicznych nad zaburzeniami układu krzepnięcia i fibrynolizy, płytek krwi oraz dysfunkcji śródbłónka naczyniowego.

Pani mgr Joanna Mikłosz jest autorką i współautorką 7 publikacji w piśmiennictwie z listy filadelfijskiej. Biorąc pod uwagę etap kariery naukowej posiada względnie duże doświadczenie w pracy w projektach badawczych, a sama rozprawa doktorska wpisuje się w kierowany przez Doktorantkę projekt Narodowego Centrum Badań (NCN) Preludium 12. Dorobek badawczy przedstawiony w pracy doktorskiej stanowią trzy publikacje: dwie z nich opublikowano w recenzowanych czasopismach o zasięgu międzynarodowym, cenionych w dziedzinie farmakologii (*Journal of Physiology and Pharmacology* w 2018 r., IF=2,544, i *Marine Drugs* w 2019 r., IF=4,073), trzecią zaś w czasopiśmie krajowym (*Folia Cardiologica* w 2017 r., punktacja MEiN=9). Doktorantka jest pierwszym autorem trzech wymienionych publikacji, co uwidacznia Jej wiodący wkład w prowadzone badania, potwierdzony także oświadczeniami współautorów. Całkowity IF włączonych do rozprawy prac to 6,617, a sumaryczna punktacja MEiN wynosi 134.

Wszystkie wymienione powyżej (trzy) publikacje składające się na zawartość rozprawy doktorskiej (Rozdział nr 1) Pani mgr Joanny Mikłosz stanowią spójne tematycznie osiągnięcie naukowe. We „Wprowadzeniu” (Rozdział nr 2) Doktorantka przedstawia w zwięzły i klarowny sposób założenia teoretyczne i podstawy hipotezy badawczej prowadzonych badań. Cel pracy, który został jasno i precyzyjnie opisany w Rozdziale nr 3, dotyczy wyjaśnienia wpływu protaminy i jej kompleksów z heparyną na płytki krwi oraz proces megakariocytopoezy, a także zbadanie takiego leczenia na potencjalne wczesne i późne powikłania zakrzepowo-zatorowe. Kolejne rozdziały opisują przebieg realizacji założonych celów naukowych oraz zastosowane metody badawcze. „Podsumowanie wyników badań i dyskusja” (Rozdział nr 4) uzupełnione o „Wnioski” (Rozdział nr 5) wraz z oryginalną publikacją naukową (Rozdział nr 10) stanowią kluczową, badawczą część rozprawy - prezentującą wyniki i ich wnikliwą analizę. W mojej ocenie uzyskane wyniki stanowią istotny wkład w rozwój dziedziny, którą zajmuje się Doktorantka, a dyskusję nad nimi oceniam wysoko pod względem merytorycznym.

Kolejna część rozprawy doktorskiej składa się z dwóch publikacji przeglądowych: napisanej w języku polskim (Rozdział nr 8) i angielskim (Rozdział nr 9). Obie publikacje są znakomitym uzupełnieniem „Wprowadzenia” pracy doktorskiej w zakresie zagadnień teoretycznych. Doktorantka posłużyła się wieloma tekstami źródłowymi oryginalnych badań naukowych, tym samym unikając cytowania prac przeglądowych, co jest dowodem na dogłębną analizę realizowanej tematyki badawczej. W pierwszym artykule na uwagę zasługuje schemat obrazujący potencjalny mechanizm małopłytkowości indukowanej protaminą oraz pozostałe czynniki mogące aktywować płytki krwi w krążeniu pozaustrojowym i tabela podsumowująca charakterystyczne cechy kliniczne tego zaburzenia. Drugi artykuł przeglądowy dotyczy farmakogenetyki trzech klas leków przeciwzakrzepowych, a mianowicie heparyn, antagonistów witaminy K i najnowszych doustnych leków przeciwzakrzepowych. Przegląd literatury koncentruje się na możliwym wykorzystaniu informacji genetycznej w terapii przeciwkrzepliwiej. Doktorantka dokładnie przedstawiła wszystkie ważne badania dotyczące polimorfizmów wpływających na skuteczność antykoagulantów. Artykuł został napisany w sposób bezstronny przedstawiając wady oraz zalety stosowania oznaczeń farmakogenetycznych w praktyce klinicznej. Wyżej wymienione przeglądy literatury dotyczą terapii antykoagulacyjnej, która jest wciąż bardzo aktualnym zagadnieniem o dużym znaczeniu

klinicznym, a graficzne przedstawienie najważniejszych danych znacznie ułatwiło analizę treści obu prac.

Rozdział nr 10 rozprawy doktorskiej stanowi oryginalny artykuł opublikowany w języku angielskim w czasopiśmie o obiegu międzynarodowym. Pani mgr Joanna Miklosz zbadała wpływ jednorazowego oraz wielokrotnego podania heparyny i protaminy na liczbę płytek krwi i ich odpowiedź, aktywację układu krzepnięcia i tworzenie się skrzepów. Postawiona w badaniach hipoteza opierała się na obecności małopłytkowości w okresie pooperacyjnym u chorych leczonych heparyną i protaminą podczas krążenia pozaustrojowego. Doktorantka nie wykazała obecności małopłytkowości u gryzoni, mimo obecności przeciwciał, co wykazały już wcześniejsze badania Zespołu kierowanego przez Pana dr hab. Andrzeja Mogielnickiego. Eksperymenty dotyczące zarówno przewlekłego, jak i jednokrotnego podania protaminy i heparyny, które bardzo czytelnie zilustrowano na schematach - zostały prawidłowo zaprojektowane. Doktorantka przeprowadziła ten zestaw badań na myszach i szczurach, a uzasadnienie wyboru modeli badawczych zostało jasno określone w pracy oryginalnej. Bardzo wartościowe naukowo jest wykorzystanie przez Doktorantkę modeli zwierzęcych do odpowiedzi na pytanie, w jaki sposób protamina i heparyna mogą powodować małopłytkowość zaobserwowaną u pacjentów. Hipoteza łącząca produkcję przeciwciał IgG przeciwko protaminie z aktywacją płytek krwi jest również nowa. Wpływ rozprawy doktorskiej byłby większy, gdyby obejmował zbadanie alternatywnych mechanizmów za pośrednictwem których protamina mogłaby przyczyniać się do małopłytkowości (jeśli nie są zaangażowane przeciwciała). Interesującym wynikiem jest zahamowanie agregacji płytek krwi po podaniu jednorazowym oraz efekt przeciwwakrzepowy przy podaniu wielokrotnym samej protaminy. **Nasuwa się pytanie: jakie mechanizmy mogą być zaangażowane w efekt przeciwpłytkowy oraz przeciwwakrzepowy protaminy?**

Omawiając rozprawę doktorską należy podkreślić, że wszystkie wyniki zostały już opublikowane w piśmiennictwie międzynarodowym, a tym samym poddane już wcześniej dokładnej analizie przez edytorów i recenzentów czasopism będących ekspertami w dziedzinie. Udział Doktorantki w prowadzonych badaniach i przeglądach literatury był dominujący i wynosił ponad 75% we wszystkich publikacjach, co zostało jasno opisane w pracy oryginalnej w *Marine Drugs* w podrozdziale „Authors contributions” oraz w załączonych do rozprawy doktorskiej oświadczeniach samej Doktorantki oraz współautorów (Rozdziały nr 12 i 13).

W odniesieniu do użytych w pracy metod eksperymentalnych zauważyć należy, że Pani mgr Joanna Miklosz w czasie wszystkich lat studiów doktoranckich opanowała bardzo szerokie spektrum metod z zakresu analityki medycznej z uwzględnieniem umiejętności prowadzenia badań na zwierzętach. Za najważniejsze odkrycia naukowe pracy doktorskiej uważam:

- udowodnienie przez Doktorantkę, że mimo potwierdzonej immunogenności sama protamina oraz protamina podana jedno- i wielokrotnie łącznie z heparyną nie powoduje małopłytkowości oraz zwiększonego ryzyka zakrzepicy, czyli objawów charakterystycznych dla zjawiska opisanego w literaturze jako PIT (*protamine-induced thrombocytopenia*), czyli małopłytkowość indukowana protaminą.

- wykazanie, że protamina bezpośrednio po podaniu zmniejsza agregację płytek krwi u gryzoni, natomiast wstrzyknięta wielokrotnie hamuje rozwój zakrzepicy tętniczej, nie wpływając na funkcje płytek krwi, parametry krzepnięcia krwi oraz proces megakariocytopoezy. **Prosiłbym o wyjaśnienie, czy biorąc pod uwagę uzyskane wyniki, protamina - od dawna znana jako środek neutralizujący działanie heparyny, mogłaby mieć inne zastosowanie w leczeniu?**

Wyniki zawarte w rozprawie doktorskiej pozwalają przypuszczać, że dodatkowa dawka protaminy paradoksalnie może zwiększać ryzyko krwawienia podczas operacji, zwłaszcza u pacjentów, którzy mieli z nią wcześniej kontakt. Do mocnych stron rozprawy doktorskiej należy użycie wystandaryzowanych modeli zwierzęcych, dobrze zaprojektowane plany eksperymentalne, badanie nowej i interesującej hipotezy oraz potencjał translacyjny badań. Zaprezentowane przez Doktorantkę wyniki badań oceniam wysoko, ponieważ ich uzyskanie wymagało gruntownego przygotowania merytorycznego jak i opanowania złożonych technik badawczych, w tym zdolności manualnych: np. przy wywołaniu zakrzepicy w tętnicy szyjnej szczura. Na podkreślenie zasługuje fakt, że Doktorantka potrafiła zrozumiale przedstawić strategię przeprowadzonych przez nią badań - co w przypadku skomplikowanych zagadnień, którymi się zajmuje z pewnością nie było zadaniem łatwym. Przedstawiona do oceny przez Panią mgr Joannę Mikłosz rozprawa doktorska jest napisana poprawną polszczyzną. Doktorantka nie uniknęła drobnych błędów językowych, niemniej nie mają one negatywnego wpływu na wartość merytoryczną wyników.

Podsumowując, przedstawiona rozprawa doktorska Pani mgr Joanny Mikłosz pod tytułem „Małopłytkowość indukowana protaminą oraz jej potencjalne powikłania zakrzepowozatorowe w eksperymentalnych modelach zwierzęcych” ma oryginalny i nowatorski charakter, a zawarte w niej wyniki badań posiadają wysokie walory poznawcze, których wartość naukowa może mieć silne odniesienie do aspektów klinicznych. Doktorantka w bardzo trafny sposób wybrała metody badawcze do swoich eksperymentów, a otrzymane przez nią wyniki zostały opublikowane w bardzo dobrym czasopiśmie naukowym. Zamieszczone tutaj uwagi i zastrzeżenia nie mają wpływu na moją bardzo wysoką ocenę pracy. Po całkowitej ocenie przedstawionej pracy z całą pewnością stwierdzam, że spełnia wszystkie zwyczajowe i ustawowe wymagania stawiane pracom doktorskim. **Podkreślając wysoki poziom merytoryczny pracy, dobry dorobek naukowy i duży wpływ wyników na rozwój dyscypliny wnioskuję także o wyróżnienie pracy. Wnoszę więc do Kolegium Nauk Farmaceutycznych Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku o dopuszczenie Pani mgr Joanny Mikłosz do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

Włodzisław Kulewski