



Łódź, dnia 07.06.2021 r.

**WYDZIAŁ BIOLOGII
I OCHRONY
ŚRODOWISKA**

Uniwersytet Łódzki

dr hab. Michał Błażej Ponczek
Katedra Biochemii Ogólnej
Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska
Uniwersytetu Łódzkiego

**Ocena pracy doktorskiej mgr Agaty Gołaszewskiej
pt. „Ocena wpływu adrenaliny na aktywność płytek krwi zdrowych ochotników”**

Cel, założenia, konstrukcja dysertacji i dorobek naukowy

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska, została zrealizowana w Zakładzie Chemii Fizycznej Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku, pod opieką merytoryczną promotora dr hab. n. med. Tomasza Rusaka oraz promotora pomocniczego dr. n. med. Tomasza Misztala. Tekst właściwy rozprawy podzielony został na pięć rozdziałów, nie licząc takich obecnych składowych pracy jak „Wykaz skrótów”, „Wnioski”, streszczenia, wykazy tabel i rycin oraz spis piśmiennictwa. Konstrukcja dysertacji jest zgodna z formą eksperymentalnych prac doktorskich.

Cel rozprawy doktorskiej mgr Agaty Gołaszewskiej jest jasno sformułowany jako „ocena wpływu adrenaliny na etapy hemostazy zależne od płytek krwi ze szczególnym uwzględnieniem roli adrenaliny w powstawaniu aktywności prokoagulacyjnej ludzkich płytek krwi w warunkach *in vitro*” i następnie jest doprecyzowany w trzech celach szczegółowych. Rozdział zawierający cel pracy oraz cała część metodyczna z wynikami, dyskusją i wnioskami (84 strony), która po tym rozdziale następuje, jest poprzedzona obszernym wstępem (41 stron) podzielonym na dwa główne podrozdziały – „Hemostaza” oraz „Adrenalina”. Mgr Agata Gołaszewska na drugiej stronie rozprawy informuje, że wyniki były prezentowane na 2 zjazdach naukowych, a praca była finansowana przez Uniwersytet Medyczny w Białymstoku w ramach trzech projektów statutowych. Autorka nie podaje w pracy informacji o innym swoim dorobku naukowym, jednakże na podstawie wyszukiwania w *Web of Science Core Collection* można ustalić, że jest współautorką przynajmniej 7 prac opublikowanych w czasopiśmie z listy ICR w latach 2018-2021, cytowanych 9 razy bez autocytowań, *h-index* 3, łączny pięcioletni JCR IF 26.038 tych publikacji (dane na dzień 4 czerwca 2021 roku), co stanowi bardzo dobry dorobek naukowy na tym etapie kariery.

tel.: +48. 42 635. 44 83, fax: +48 42 635 44 84,
ul. Pomorska 142/432, 90-236 Łódź
e-mail: michal.ponczek@biol.uni.lodz.pl

➔ www.uni.lodz.pl

Rozprawa doktorska została przygotowana starannie (dopatrzyłem się jedynie nielicznych uchybień wymagających poprawy korektorskiej, wymienione na końcu recenzji – „Uwagi korektorskie”) i jest z jednej strony merytorycznym kompendium wiedzy naukowej o roli adrenaliny w układzie hemostazy, a z drugiej badawczym uzupełnieniem tej wiedzy o nowe informacje oraz wnioski poprzez zaplanowane i zrealizowane doświadczeń, których wyniki rzucają nowe światło na wcześniejsze ustalenia i ewentualne niejasności, co do znaczenia tego hormonu w fizjologii i patologii procesów związanych z krzepnięciem krwi.

Autorka pracy we wstępie na stronie 12, w podrozdziale Hemostaza bardzo słusznie rozpoczyna od przedstawienia czytelnikowi płytek krwi jako najmniejszych elementów morfotycznych krwi ludzkiej. Mimo, że w literaturze klinicznej używa się nazwy trombocyt jako synonim nazwy płytka krwi i w definicji tego słowa wg *Encyclopedia Briannica (EB)* jest podane jako drugie także takie wyjaśnienie:

“Thrombocyte, a small, nucleated, spindle-shaped cell of nonmammalian vertebrates that plays a role in the clotting of blood; or a blood platelet, a small, non-nucleated, cytoplasmic body found in the blood of mammals, which similarly plays a role in the clotting of blood. See also platelet”,

ze względu na specyfikę płytek krwi występujących tylko u ssaków jestem zwolennikiem odróżniania tych pojęć (pierwsza definicja w podanym powyżej cytacie z *EB dla trombocytów*), ze względu na to, że trombocyty występujące u pozostałych kręgowców są jądrzaste, znacznie większe i nie tworzą się przez odszczepienie z wielkiej poliploidalnej komórki jaką jest megakariocyt. Pod tym względem trombocyty np. ptaków zdecydowanie zasługują na nazwę komórki (-cyt, z języka starogreckiego *κότος*), co nie umniejsza w żaden sposób znaczenia mniejszych pozbawionych jądra komórkowego płytek ssaków, w tym płytek człowieka. Nie jest to oczywiście, formalnie żadna merytoryczna uwaga z mojej strony, a jedynie opinia, a niewątpliwym błędem byłoby oczywiście nazywanie płytkami krwi komórek, które występują np. u ptaków. Płytki krwi ssaków są niewątpliwie tak oryginalnym ewolucyjnym osiągnięciem ssaków, że warto o tym pamiętać i uhonorować je odrębną nazwą od tego co występuje u pozostałych kręgowców.

Strona 18 zawiera rycinę 3 - receptory płytkowe wiążące kolagen i vWF, gdzie nie wszystkie skróty kompleksów białkowych są umieszczone w „Wykazie skrótów” na stronach 9-11. Być może przydatne byłoby rozszerzenie opisu tej ryciny, tak aby elementy składowe kompleksów związanych z błoną były łatwiejsze do pojęcia.

Podrozdział „Adrenalina” na stronie 47, wiersz 16 od dołu zawiera dość długie zdanie, trudne do zrozumienia z powodu dość zagmatwanej i nie całkiem poprawnej konstrukcji gramatycznej:

„Co interesujące, pomimo tego, że adrenalina (1-100 μ M) wywołuje agregację ludzkich płytek krwi zawieszonych w osoczu bogatopłytkowym (*platelet rich plasma* – PRP), to po izolacji tych komórek i ich ponownym zawieszeniu w środowisku sztucznym (płytki płukane – *washed platelets*) zawierającym jony wapnia, co sugeruje, że w takich warunkach adrenalina jest słabym induktorem sekrecji, niezbędnej do dostarczenia fibrynogenu potrzebnego do zajścia agregacji.”

Czy czegoś w tym zdaniu powyżej nie brakuje?

Na stronie 51 brak znaku podziału wiersza (końca linii) po opisie ryciny 13.

Niezależnie od tych drobnych uwag wstęp (część teoretyczną) uważam za bardzo ciekawy i wartościowy naukowo.

W rozdziale 3 „Cel pracy” strona 54, wiersz drugi od góry) w zdaniu „Z jednej strony stężenia adrenaliny powodujące aktywację płytek są co najmniej o rząd wielkości wyższe od tych spotykanych fizjologicznie w osoczu (...)”

Przydałoby się sformułowanie „*in vitro*”, tak by zdanie brzmiało bardziej ściślej:

„Z jednej strony stężenia adrenaliny powodujące aktywację płytek *in vitro* są co najmniej o rząd wielkości wyższe od tych spotykanych fizjologicznie w osoczu. (...)”

Mgr Agata Gołaszewska w kolejnym rozdziale zaprezentowała zastosowane w rozprawie metody badawcze oraz stosowane do doświadczeń materiały. Głównym materiałem badanym była krew żylna pobierana od zdrowych ochotników, a badania uzyskały zgodę Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku, z której pozyskiwano także osocze bogatopłytkowe, a z niego płytki krwi płukane. Uzyskiwana była także apiraza poprzez preparatykę z ziemniaków. Zastosowano liczne metody doświadczalne opisane na 18 stronach rozprawy. Eksperymenty były przeprowadzane od 3 do 16 niezależnych przypadków (informacje o liczbie przypadków w danym eksperymencie zostały podane w opisie rycin z wynikami), a wyniki poddane analizom statystycznym. Moją szczególną uwagę zwróciła metoda „Pomiar kinetyki retrakcji skrzepu bez udziału trombiny” ze względu na ilościową ocenę retrakcji na podstawie obrazów obszaru zajmowanego przez skrzep w programach MotiC Images Plus 2.0 ML, GraphPad Prism 5 oraz z użyciem autorskiej aplikacji w języku C#, gdzie stosowano także wzór:

$$\text{procent retrakcji skrzepu} = \frac{\text{obszar } t_0 - t}{\text{obszar } t_0} \times 100\%,$$

gdzie t_0 – powierzchnia całkowita zawiesiny, a

t – powierzchnia skrzepu w danym punkcie czasowym

Poza zaprezentowanym wzorem i krótkim opisem nie znalazłem w pracy szczegółów obliczeniowych tej metody, także w opisie ryciny 23, gdzie zostały zaprezentowane wyniki. Zakładam, że wartości z poszczególnych czasów i przypadków były przetwarzane obliczeniowo w autorskiej aplikacji napisanej w C#. Prosiłbym o udostępnienie kodu źródłowego wzmiankowanej aplikacji w C#, aby zapoznać się z algorytmem użytym do obliczeń.

Wnioski końcowe

Podsumowując należy podkreślić zróżnicowanie zastosowanych metod badawczych oraz uzyskane cenne wyniki z zaplanowanych i zrealizowanych eksperymentów. Na szczególne zaznaczenie zasługuje zbadanie wpływu adrenaliny na hemostazę *in vitro* w warunkach statycznych oraz przepływu przy niskich nanomolowych stężeniach tego hormonu, czyli w okolicznościach bardzo zbliżonych do takich jakie występują *in vivo*. Zaledwie jeden inny zespół naukowy opublikował do tej pory wyniki badań w podobnym układzie doświadczalnym, w warunkach statycznych (Eriksson AC, Whiss PA. Nanomolar concentrations of adrenaline induce platelet adhesion *in vitro*. Platelets. 2013; 24(2):129-135.), a mgr Agata Gołaszewska odnosi się do tej publikacji najpierw na stronie 52 wstępu:

4
„Badania Eriksson i wsp. wskazują na zwiększenie adhezji płytek krwi ekspozowanych na adrenalinę do powierzchni pokrytych kolagenem w warunkach statycznych (brak przepływu). Warto podkreślić, że są to jedyne opublikowane dotychczas wyniki badań, w których zademonstrowano potencjalizację odpowiedzi płytek krwi przez niskie nanomolowe stężenia adrenaliny, a więc stężenia fizjologicznie bardzo prawdopodobne (...)”, a następnie na 115 stronie dyskusji:

„To zróżnicowanie wynikające z odmiennych warunków przepływu jest dość nieoczekiwane, ponieważ Eriksson i Whiss wykazali zwiększone osadzanie się płytek krwi stymulowanych adrenaliną na włóknach kolagenowych w warunkach statycznych [130]. Rozbieżność w rezultatach może wynikać z użycia różnych warunków eksperymentalnych. Eriksson i Whiss za marker adhezji przyjęli aktywność enzymatyczną fosfatazy kwaśnej pochodzącej z monowarstwy płytek związanych z kolagenem. Adhezja oceniana w taki sposób jest bezpośrednio związana z liczbą płytek związanych z kolagenem. Natomiast podejście do oceny adhezji w tej pracy obejmowało zarówno wizualizację procesu powstawania agregatów płytkowych na powierzchni 116 kolagenowej w warunkach przepływu, jak i oszacowanie pokrycia przez nie owej powierzchni.”

Pewne zaobserwowane i wyjaśniane przez autorkę rozbieżności są doskonałym punktem startu do dalszych badań.

Stwierdzam, że oceniana rozprawa doktorska spełnia wymagania zawarte w aktualnie obowiązujących regulacjach prawnych, które są stawiane kandydatom ubiegającym się o stopień naukowy doktora i zasługuje na szczególne uznanie. Wnoszę do Senatu Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku o dopuszczenie mgr Agaty Gołaszewskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu, dyscyplinie nauki medyczne.

Uwagi korektorskie:

W pracy w wielu miejscach pojawia się „cytosol” (w różnych formach gramatycznych), a o ile mi wiadomo wersją poprawną w języku polskim jest cytozol.

Strona 126, wiersz 3 od dołu jest „sosodowych”, powinno być „sodowych”.

Strona 126, wiersz 17 od dołu jest „istotny mechanizmem”, powinno być „istotnym mechanizmem”.



Dr hab.
Michał Błażej Ponczek