

Białystok, 30.08.2023 r.

Dr hab. n. med. Ewa Gruszevska
Uniwersytet Medyczny w Białymstoku
Zakład Diagnostyki Biochemicznej
15-269 Białystok; ul. Waszyngtona 15A
e-mail: ewa.gruszevska@umb.edu.pl

Recenzja rozprawy doktorskiej

mgr Aliny Rak-Pasikowskiej

pt. „Znaczenie metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej

i zanieczyszczeń leukocytarnych w procesie aktywacji płytek krwi

w preparatach przeznaczonych do transfuzji”

Promotor pracy: dr hab. Iwona Bil-Lula, prof. UMW

Według danych Ministerstwa Zdrowia w Polsce każdego roku wykonuje się ok. 1,7 mln transfuzji krwi lub preparatów krwiopochodnych. Dodatkowo postęp w medycynie, rozwój nowoczesnych metod leczenia i przeprowadzania skomplikowanych zabiegów operacyjnych powodują, że zapotrzebowanie na krew skokowo rośnie, zwłaszcza w takich dziedzinach jak hematologia, chirurgia serowo-naczyniowa, onkologia oraz transplantologia. Obecnie transfuzja krwi pełnej przeprowadzana jest bardzo rzadko, ze względu na ryzyko pojawienia się odczynów związanych z podaniem zbędnych elementów. Dlatego zwykle przetacza się tylko te składniki krwi, których niedobór został stwierdzony, m.in. transfuzja koncentratów krwinek czerwonych (KKCz), krwinek białych, koncentratów krwinek płytkowych (KKP) czy preparatów osocza. Niestety krew oraz poszczególne jej składniki są

materiałem, którego nie można pozyskać ani wyprodukować sztucznie, a jedynie pobrać od dawców, których liczba z kolei z każdym rokiem z różnych powodów spada. KKP znalazły szerokie zastosowanie w transfuzjologii, głównie w celu zapobiegania i leczenia małopłytkowości. Wadą KKP jest krótki termin przydatności do użycia (maksymalnie 5 do 7 dni), co wynika z szybko postępującego procesu „starzenia się” płytek (PSL) związanego przede wszystkim z obniżeniem ich zdolności do agregacji. Dodatkowo jednym z głównych czynników rzutujących na gorszą odpowiedź kliniczną u chorych po transfuzji może być obecność w KKP leukocytów i substancji, które są z nich uwalniane, np. cytokin prozapalnych czy metaloproteinaz. Zniwelowanie wpływu czynników powodujących PSL, które obecnie nie są jeszcze w jednoznaczny sposób zidentyfikowane, znacząco wydłużyłoby okres przechowywania płytek krwi. Dlatego tematyka pracy doktorskiej mgr Aliny Rak-Pasikowskiej, skupiająca się na określeniu znaczenia metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej i zanieczyszczeń leukocytarnych w procesie aktywacji płytek krwi w preparatach przeznaczonych do transfuzji, dotyczy aktualnego problemu stanowiącego ważne wyzwanie i bardzo dobrze wpisuje się w oczekiwania środowiska zarówno transfuzjologów jak i lekarzy klinicyistów.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska została przygotowana w formie klasycznej monografii naukowej o typowym układzie dla dysertacji doktorskich. Praca, licząca w sumie z wykazami 167 stron wydruku, została podzielona na: wstęp wraz z celem pracy, materiały i metody, wyniki, omówienie wyników i dyskusję, wnioski i piśmiennictwo. Ponadto uzupełniają ją 52 ryciny i 6 tabel, streszczenie w języku polskim i angielskim, wykazy: rysunków, tabel i stosowanych skrótów oraz suplement będący życiorysem naukowym Autorki.

W rozdziale „Wstęp” Doktorantka zawarła szczegółowe informacje dotyczące procesu powstawania, budowy, aktywacji i agregacji płytek krwi oraz opis trombocytopatii i innych

zaburzeń związanych z płytkami krwi wraz z ich znaczeniem w transfuzjologii. Ponadto Pani mgr Alina Rak-Pasikowska skrupulatnie omówiła otrzymywanie koncentratów krwinek płytkowych, uszkodzenia płytek podczas przechowywania KKP oraz powikłania związane z ich przetaczaniem. W kolejnej części tego rozdziału Autorka przybliżyła informacje dotyczące budowy i podstawowych funkcji metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej (MMP). W mojej ocenie wstęp jest napisany przejrzysto z odpowiednio dobranymi pozycjami literaturowymi, a sposób przedstawienia problemu wskazuje na doskonałą wiedzę i wyraźnie sygnalizuje zainteresowania badawcze Doktorantki.

Cel rozprawy doktorskiej mgr Aliny Rak-Pasikowskiej, przedstawiony w sposób bardzo dokładny, polegał na określeniu czy obecność leukocytów oraz metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej prowadzi do obniżenia jakości KKP i czy jest przyczyną zmian w reaktywności i aktywacji płytek. Ponadto czy w trakcie przechowywania KKP dochodzi do zmian stężenia i aktywności MMP-2 i MMP-9 oraz ekspresji ich genów w płytkach krwi, oraz czy farmakologiczne hamowanie aktywności MMP w KKP może prowadzić do wolniejszej aktywacji płytek krwi, a tym samym ich wolniejszego starzenia.

W rozdziale „Materiały i metody” Autorka opisuje materiał badany, który stanowiło 9 koncentratów krwinek płytkowych przygotowanych w Dziale Preparatyki Krwi Regionalnego Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa im. Prof. Tadeusza Dorobisza we Wrocławiu. Każdy z KKP został podzielony na trzy części: pierwszą, której nie poddawano dodatkowym procedurom (NF); drugą, którą poddano filtracji w celu usunięcia leukocytów (F) oraz trzecią, do której dodano inhibitor metaloproteinaz – doksycyklinę (D). W kolejnej, dość szczegółowo opisanej, części tego rozdziału Autorka przybliżyła procedury przeprowadzonych badań: sposób przeprowadzenia analizy morfologicznej, analizy cytofluorymetrycznej, oznaczenia stężeń (testy ELISA) i aktywności (zymografia żelatynowa) MMP-2 oraz MMP-9 w wyizolowanych płytkach jak i oceny ekspresji mRNA (real-time PCR) w tych

metaloproteinazach. Na szczególną uwagę zasługuje trafny dobór metod badawczych i ich fachowa metodyka, za co należą się również słowa uznania dla Pani Promotor pracy, co w mojej ocenie zapewniło uzyskanie w pełni wiarygodnych wyników badań. Rozdział „Materiały i metody” został uzupełniony opisem właściwie zastosowanych analiz statystycznych oraz informacją o uzyskanej zgodzie Komisji Bioetycznej.

Wyniki zostały przedstawione w sposób przejrzysty, uporządkowane w postaci podzielonych tematycznie podpunktów i zilustrowane, aż 49 rycinami. Doktorantka wykazała, iż proces filtracji, jak również dodatek inhibitora MMP w postaci doksycykliny nie wpływał na zmianę liczby płytek krwi podczas przechowywania KKP, natomiast prowadził do wyższego stopnia aktywacji płytek krwi, co z kolei sprzyjało pojawianiu się agregatów płytkowych pod koniec przechowywania KKP. Ponadto Autorka wykazała, iż podczas przechowywania KKP dochodzi do stopniowej aktywacji płytek krwi i obniżenia ich zdolności do agregacji. Wraz ze wzrostem liczby leukocytów w KKP wzrasta aktywność MMP, dlatego mogą stanowić one potencjalne źródło metaloproteinaz w koncentratkach płytkowych. Bardzo ważnym wynikiem jest wykazanie, iż obecność doksycykliny w KKP obniża ekspresję markerów aktywacji w porównaniu do koncentratów filtrowanych, co potencjalnie może pozwolić na zwiększenie efektywności transfuzji.

Doktorantka poprowadziła w zwięzły sposób interesującą dyskusję, odnosząc uzyskane wyniki do dostępnych danych literaturowych oraz podkreślając za każdym razem rozbieżności i podobieństwa wyników własnych z osiągnięciami literaturowymi innych autorów. Autorka dokonała szczegółowej analizy, a podejmując próby wyjaśnienia przyczyn i mechanizmów uzyskania sprzecznych wyników wykazała się dobrym warsztatem i dojrzałością badawczą. Ponadto prawidłowa analiza własnych w odniesieniu do tych uzyskanych przez innych badaczy wyników, świadczy o dobrym przygotowaniu merytorycznym w zakresie prezentowanego tematu rozprawy. Na podstawie

przeprowadzonych badań i dyskusji mgr Alina Rak-Pasikowska sformułowała 6 wniosków. Wnioski logicznie wynikają z uzyskanych wyników i odpowiadają postawionym przez Doktorantkę celom pracy.

Rozprawę kończy rozdział „Piśmiennictwo”, w którym Pani mgr Alina Rak-Pasikowska zawarła 176 pozycji literaturowych, głównie obcojęzycznych ujętych w wykazie *Journal Citation Report*, co świadczy o rzetelnym studium literatury światowej. Publikacje stanowią doniesienia z lat 1959 - 2022, z czego 29 prac (co stanowi ok. 17%) pochodzi z ostatnich 5 lat.

W rozdziałach 9 i 10 Autorka zamieściła streszczenia w języku polskim i angielskim, w których w sposób zrozumiały przedstawia założenia i cel badań, materiały i metody, uzyskane wyniki oraz wnioski.

Z obowiązku jako Recenzenta przedłożonej mi do oceny rozprawy doktorskiej chciałabym zaznaczyć pojedyncze sugestie:

- 1) nie udało się Doktorantce uniknąć błędów interpunkcyjnych (np. str. 9, 16, 19, 25, 27, 31, 35, 43, 47, 50, 127) oraz pojedynczych błędów edytorskich i składniowych (np. str. 8 „*Jesto to...*” oraz „*Odczyn (pH) ziarnistości gęstych jest niższe...*”, str. 12 „*Płytki krwi zawierają...*”, str. 16 „*...poprzez połączenie..*”, czy str. 131 „*...skutecznie zmniejszałą mózgową aktywność...*”);
- 2) dodatkowo na str. 71 - 73 brakuje nagłówka „Wyniki”, natomiast dalszą część wyników na str. 74 - 124 w nagłówku błędnie przyporządkowano do rozdziału „Omówienie wyników i dyskusja”, co może być mylące dla czytelnika;
- 3) w wykazie skrótów zabrakło kilku zastosowanych w rozprawie, np. BSA, MAC-1, PECAM-1, PRP, PPP, ADAMTS-13 czy TACE, ponadto sugerowałabym aby w spisie skrótów, w celu ujednoczenia, wprowadzić we wszystkich pozycjach rozwinięcie nazw także w języku angielskim;

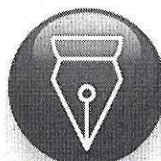
- 4) sugerowałabym również zastąpienie słowa „rysunek” terminem „rycina”, co brzmi bardziej formalnie;
- 5) w dyskusji Doktorantka słusznie zauważa ograniczenia przeprowadzonych badań, m.in.: stosunkowo małą liczebność koncentratów krwinek płytkowych poddanych analizie (N=9). Jednak uzasadnienie tej liczebności, iż są to cenne do uzyskania składniki krwi wykorzystywane w praktyce klinicznej, jest również w pełni zrozumiałe, a uczciwe i krytyczne przedstawienie ograniczeń badania świadczy o dojrzałości naukowej Doktorantki;
- 6) wnioski są wprawdzie odpowiedzią na wcześniej postawione cele, ale miejscami są bardziej omówieniem uzyskanych wyników.

Pragnę jednak zaznaczyć, iż wskazane przeze mnie niedociągnięcia nie ujmują w żaden sposób wartości merytorycznej rozprawy doktorskiej, którą oceniam bardzo wysoko, a mają jedynie na celu jej udoskonalenie przed publikacją wyników.

Uważam, iż przedstawiona mi do recenzji dysertacja jest dobrze zaprojektowanym i starannie przeprowadzonym projektem badawczym o dużej wartości zarówno poznawczej jak i praktycznej, a mgr Alina Rak-Pasikowska właściwie wywiązała się z realizacji założonych celów pracy, która zawiera wszystkie wymagane elementy rozprawy doktorskiej. Interesujące wyniki zostały przedstawione w sposób logiczny i konsekwentny, co wskazuje na umiejętność Doktorantki do samodzielnego projektowania i prowadzenia prac badawczych.

Reasumując, stwierdzam iż rozprawa doktorska autorstwa Pani mgr Aliny Rak-Pasikowskiej pt. „Znaczenie metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej i zanieczyszczeń leukocytarnych w procesie aktywacji płytek krwi w preparatach przeznaczonych do transfuzji” stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego i spełnia warunki określone w art. 13 ust. 1 Ustawy z 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2017 roku poz. 1789 ze

zm.) w związku z art. 179 ust. 2 i 3 Ustawy z 3 lipca 2018 roku Przepisy wprowadzające ustawę - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018 r. poz. 1669 ze zm.). Wnoszę do Rady Dyscypliny Nauki Farmaceutyczne Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu o dopuszczenie rozprawy mgr Aliny Rak-Pasikowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Signed by /
Podpisano przez:

Ewa Gruszewska

Date / Data:
2023-09-06
11:01

Ewa Gruszewska
dr hab. n. med. Ewa Gruszewska