



Wydział Farmaceutyczny  
kierunek: Analityka Medyczna

## Recenzja

rozprawy doktorskiej Pani mgr Aliny Rak-Pasikowskiej  
p.t. „Znaczenie metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej  
i zanieczyszczeń leukocytarnych w procesie aktywacji płytek krwi  
w preparatach przeznaczonych do transfuzji”

wykonanej w Zakładzie Chemii Klinicznej i Hematologii Laboratoryjnej  
Katedry Analityki Medycznej

Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu

Promotor: **Dr hab. n. farm. Iwona Bil-Lula, prof. uczelni**

Koncentraty krwinek płytkowych są powszechnie stosowane w transfuzjologii podczas zapobiegania i leczenia małopłytkowości bądź zaburzeń funkcji płytek krwi. Istotnym problemem klinicznym jest bardzo krótki termin użyteczności koncentratu krwinek płytkowych (KKP), co wpływa na ich przydatność terapeutyczną. Problem ten jest szeroko badany ale jak dotychczas nie dysponujemy wystarczającymi danymi o mechanizmach uszkodzeń płytek krwi podczas przechowywania koncentratu. W czasie przechowywania dochodzi do zmian struktury i funkcji płytek, co bezpośrednio determinuje skuteczność leczenia. Zatem temat rozprawy doktorskiej Pani mgr Aliny Rak-Pasikowskiej wydaje się być niezwykle ciekawy i ważny z punktu widzenia klinicznego zastosowania koncentratu krwinek płytkowych. Na szczególną uwagę zasługuje fakt zwrócenia uwagi na rolę metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej (MMPs) w procesie aktywacji płytek krwi, prowadzących do uszkodzenia a tym samym zmniejszających efektywność kliniczną transfuzji. W dotychczasowej literaturze brak jest również doniesień dotyczących zanieczyszczeń leukocytarnych w procesie aktywacji płytek krwi w preparatach przeznaczonych do transfuzji. Autorka przede wszystkim zwróciła uwagę na płytkową MMP-2 oraz pochodzącą, najprawdopodobniej z leukocytarnych zanieczyszczeń MMP-9. Poznanie roli tych metaloproteinaz w procesie aktywacji płytek krwi podczas przechowywania KKP może się przyczynić do wypracowania warunków prowadzących do zachowania funkcjonalności płytek krwi, a tym samym wydłużenia czasu przydatności przechowywanego KKP.

Rozprawa ma typowy układ pracy doktorskiej. Zachowano prawidłowe proporcje pomiędzy poszczególnymi rozdziałami. Rozprawę otwiera krótkie ale treściwe wprowadzenie oraz bogaty wstęp. We wstępie Autorka opisuje mechanizmy powstawania płytek krwi, ich budowę z uwzględnieniem receptorów i glikoprotein błonowych a także omawia procesy aktywacji i agregacji trombocytów oraz ich znaczenie w procesach niezwiązanych bezpośrednio z hemostazą w zakresie procesów fizjologicznych, jak i patologicznych. Po takim wprowadzeniu Doktorantka przechodzi płynnie do zagadnień związanych z KKP w aspekcie ich wykorzystania w transfuzjologii, ze szczególnym uwzględnieniem uszkodzenia płytek krwi podczas przechowywania. Istotnym elementem wstępu są również problemy związane z interakcją metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej z płytkami krwi. Sposób omówienia zagadnień, zaprezentowanych we wstępie rozprawy wskazuje na dobrą znajomość literatury przedmiotu i znaczne przygotowanie do realizacji podjętych zadań badawczych przez Doktorantkę.

Cel pracy został przedstawiony jasno i precyzyjnie, z zaznaczeniem kolejnych sekwencji badawczych, uwzględniających: sprawdzenie wpływu wybranych czynników (zanieczyszczeń leukocytarnych oraz MMPs) na jakość KKP oraz na zmiany reaktywności i aktywacji płytek krwi. Godnym podkreślenia jest fakt próby oszacowania: czy w trakcie przechowywania koncentratu dochodzi do zmian stężenia i aktywności obydwu oznaczanych przez Doktorantkę metaloproteinaz: MMP-2 i MMP-9 oraz ekspresji ich genów w płytkach krwi a także sprawdzenie czy zastosowanie farmakologicznego inhibitora MMPs – doksycykliny może prowadzić do poprawy jakości KKP w czasie ich przechowywania. Uzyskanie zadawalających wyników będzie „zielonym światłem” do dalszych badań w tym kierunku, aby wydłużyć czas przechowywania wysokiej jakości KKP. Czy zatem, *w kolejnym etapie badań nie byłoby istotne poszerzenie panelu badawczego o fizjologiczne inhibitory metaloproteinaz (TIMPs) w celu sprawdzenia czy hamowanie aktywności metaloproteinaz podczas przygotowywania i przechowywania KKP może poprawić skuteczność transfuzji?*

Badania recenzowanej rozprawy doktorskiej zostały przeprowadzone w 3 modelach doświadczalnych z wykorzystaniem kożuszków leukocytarno-płytkowych: 1). poddanych filtracji, 2). pozostawiony bez dodatkowych procedur filtracyjnych (niefiltrowane kożuszki) oraz 3). z dodatkiem doksycykliny w końcowym stężeniu 10 $\mu$ M. Badając kinetykę zmian funkcji płytek oznaczenia wykonywano w następującym schemacie badawczym: 1). w czasie 0h, 2). po 24h przechowywania, 3). po 48h przechowywania, 4). po 72h przechowywania oraz 5). po 144h przechowywania. W każdym punkcie czasowym Doktorantka oceniała



m.in.: morfologię preparatów hematologicznych, agregację płytek krwi oraz wykonywała analizę cytofluorymetryczną. Ponadto, z każdej oddzielonej próbki izolowała płytki krwi i przygotowywała „nadsącz”. Materiały te posłużyły do dalszej analizy, oceniając w wyizolowanych płytkach względną ekspresję genów z wykorzystaniem reakcji real-time PCR, zaś w płytkach oraz w nadsączu – aktywność obydwu metaloproteinaz: MMP-2 i MMP-9. Zastosowana w pracy doktorskiej metodyka jest nowoczesna i stosowana w specjalistycznych laboratoriach badawczych. Wszystkie metody zostały szczegółowo opisane, zapewniając uzyskanie wiarygodnych i powtarzalnych wyników badań laboratoryjnych.

Przedstawione wyniki badań wykazały, że wraz z czasem przechowywania KKP (we wszystkich modelach badawczych) - liczba płytek krwi nie ulegała obniżeniu, podczas gdy agregacja płytek krwi indukowana różnymi agonistami: ADP, kolagen, epinefryna oraz kwas arachidonowy ulegała znacznej redukcji. Ponadto, wraz z czasem przechowywania (we wszystkich modelach KKP) zaobserwowano wzrost ekspresji aktywowanego receptora dla fibrynogenu – GPIIb/IIIa, cząsteczki CD63 oraz powierzchniowej ekspresji P-selektyny (CD62P), podczas gdy nie zmieniało się wiązanie aneksyny V (markera aktywacji płytek krwi i wczesnego stadium apoptozy) na powierzchni płytek krwi.

Doktorantka zwróciła uwagę, że KKP z dodatkiem doksycykliny manifestowały się najniższym poziomem ekspresji markerów aktywacji płytek krwi w najdłuższym czasie przechowywania (144h), podczas gdy najwyższe poziomy ekspresji markerów aktywacji płytek zaobserwowano w filtrowanym KKP. Różnorodne efekty w 3 modelach doświadczalnych KKP zostały ujawnione w aspekcie aktywności MMPs i ekspresji genów dla odpowiednich MMPs. W przypadku MMP-2 zaobserwowano zmniejszenie aktywności wraz z czasem przechowywania KKP a nie stwierdzono różnic w aktywności tej MMP w płytkach krwi pomiędzy różnymi rodzajami KKP. W nadsączach koncentratów niefiltrowanych w najdłuższym czasie przechowywania (144h) zaobserwowano wyższe stężenie MMP-2. Ekspresja genu *MMP-2* ulegała podwyższeniu wraz z czasem przechowywania bez względu na rodzaj zastosowanego KKP. Zróznicowanie zauważono również w zakresie MMP-9 albowiem aktywność tej MMP w płytkach krwi była wyższa w niefiltrowanym KKP w stosunku do filtrowanych KKP po 72h i po 144h przechowywania, natomiast ekspresja genu *MMP-9* ulegała wzrostowi wyłącznie w preparatach niefiltrowanych (zawierających leukocyty). Podsumowując kinetykę zmian ekspresji obydwu genów pomiędzy różnymi rodzajami KKP stwierdzono, że ekspresja genów w trakcie przechowywania

koncentratów płytkowych w wersji filtrowanej była na najniższym poziomie. Zaś, w nadsączach koncentratów zawierających leukocyty stężenia obydwu metaloproteinaz wykazują dodatnią aczkolwiek umiarkowaną korelację z ekspresją aktywnej formy GPIIb/IIIa. Uzyskane wyniki badań eksperymentalnych zostały poddane gruntownej analizie, pozwalając na odpowiedź na wcześniej postawione pytania w celach pracy, zwłaszcza tych szczegółowych.

Rozprawę wieńczy obszerna i bardzo ciekawa dyskusja, w której Doktorantka wykazała się wręcz znakomitą znajomością literatury przedmiotu badań a także krytyczną oceną uzyskanych wyników. Główną osią dyskusji jest przedstawienie uzyskanych wyników na tle badań innych autorów. Bardzo ważnym wynikiem przedstawionym przez Doktorantkę jest istotny, zależny od czasu przechowywania spadek aktywności agregacyjnych płytek krwi, pochodzących ze wszystkich badanych KKP. Zadziwiającym jest jednak fakt, że Autorka nie wiąże tych zmian z aktywnością MMP-9. Wprawdzie płytkowe pochodzenie MMP-9 jest nadal dyskutowane, to jednak coraz więcej doniesień wskazuje, że ludzkie płytki krwi uwalniają MMP-9, która znacząco hamuje agregację płytek. Mechanizmy aktywacji płytek przez MMP-9 są szeroko badane i obejmują one prawdopodobnie hamowanie szlaków aktywacji fosfolipazy C, a następnie także rozpadu fosfoinozytolu, aktywację kinazy białkowej C i tworzenie tromboksanu A<sub>2</sub>, co prowadzi do zahamowania wewnątrzkomórkowej mobilizacji jonów Ca<sup>2+</sup>. Liczę na wyczerpującą dyskusję podczas obrony: *dotyczącą pochodzenia MMP-9 oraz mechanizmów jej p/płytkowego działania.*

Kończące rozprawę wnioski przedstawione w sześciu punktach są bardzo ostrożne ale konkretne. Warto także zaznaczyć, że znajdują potwierdzenie w wynikach przeprowadzonych badań doświadczalnych.

Autorka nie ustrzegła się jednak drobnych uwag edytorskich dotyczących prezentowanych badań eksperymentalnych. W rozdziale III: *Wyniki*, dotyczącym wyników pracy raptownie została zastosowana zmiana, a dokładnie od strony 74 został zamieszczony kolejny rozdział: *Omówienie wyników i dyskusja*, który to rozdział jest już rozdziałem IV. Czym podyktowana jest ta nieoczekiwana i nieuzasadniona zmiana? Czy jest to tylko „chochlik edytorski”? Ponadto, istotną uciążliwością edytorską jest sposób prezentacji wyników. Wyniki prowadzonych oznaczeń przedstawiono w postaci 49 rycin, które Autorka nie wieciec dlaczego nazywa rysunkami a nie rycinami. Poszczególne ryciny obrazujące zmiany ekspresji, stężenia lub aktywności składają się z pięciu wykresów na dwóch oddzielnych stronach. Taki



sposób prezentacji utrudnia analizę przedstawianych danych. Wydaje się, że bardziej przyjaznym dla czytelnika byłoby przedstawienie wyników w postaci wykresów liniowych, obrazujących zależność stężenia danego parametru od czasu przechowywania. Taka forma jednoznacznie obrazowałaby zarówno tendencję, jak i zakres stwierdzanych zmian. Nie mniej pragnę nadmienić, że sformułowane przeze mnie te drobne uwagi i spostrzeżenia nie podważają wysokiej, merytorycznej wartości przedstawionej do recenzji rozprawy doktorskiej. Praca ta bowiem, cechuje się wysokim i cennym walorem praktycznym.

Podsumowując uważam, że dysertacja doktorska, autorstwa Pani mgr Aliny Rak-Pasikowskiej spełnia warunki określone w art.13 ust.1 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. 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 2018r. poz. 1669 ze zm.).

Mam zaszczyt i przyjemność zwrócić się do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauk Farmaceutycznych Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu z wnioskiem o dopuszczenie rozprawy Pani mgr Aliny Rak-Pasikowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie, uwzględniając wysoką wartość merytoryczną rozprawy i nowatorski charakter wyników badań, wnoszę o jej wyróżnienie.

  
Prof. dr hab. n. med. Grażyna Sygitowicz