



Prof. dr hab. Dariusz Sitkiewicz  
Warszawski Uniwersytet Medyczny

2N-BF 4100. 3. 2021  
Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu  
BIURO RPI 13027/2024  
RADY DISCYPLINY NAUKI FARMACEUTYCZNE  
Podpis Balenka 17.07.2024r.

## Recenzja rozprawy doktorskiej

pt. „Wpływ płytek krwi i mikrocząsteczek pochodzenia płytkowego na uszkodzenie kardiomiocytów  
w warunkach chemicznego niedokrwienia i reperfuzji”

wykonanej w Katedrze Analityki Medycznej Uniwersytetu Medycznego im, Piastów Śląskich  
we Wrocławiu

przez mgr Kornelę Hałucha

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

Podczas zawału mięsień sercowy przechodzi przedłużony okres niedokrwienia. Terapia reperfuzyjna jest niezbędna do zminimalizowania uszkodzenia serca, ale paradoksalnie powodje dalsze uszkodzenia. Procedury eksperymentalne mające na celu ograniczenie uszkodzenia niedokrwienno-reperfuzyjnego (I/R) koncentrują się na kardiomiocytach ponieważ to one mają kluczowe znaczenie dla czynności serca. Zaproponowano kilka mechanizmów molekularnych w celu wyjaśnienia patologicznych zmian w urazie I/R, w tym uwalnianie reaktywnych form tlenu (ROS), przeciążenie wapniem, wyczerpanie energii, dysfunkcję mitochondriów i zaprogramowaną aktywację apoptozy. Mitochondria zostały uznane za kluczowe „wyzwalacze” sercowego urazu I/R. Przede wszystkim dlatego, że kardiomiocyty zawierają duże ilości mitochondriów, które zapewniają ponad 90% podaży energii. Ponadto, w mechanizmach urazu I/R istotne znaczenie ma przeciążenie wapniem, stres oksydacyjny, stres retikulum endoplazmatycznego i odpowiedzi immunologiczne, które to procesy są wyzwalane i wzmacniane przez dysfunkcję mitochondriów.

W niniejszej pracy Autorka podjęła badania nad kluczowym aspektem mechanizmów niedokrwienno/reperfuzyjnego uszkodzeniu serca a mianowicie nad, jak niektórzy uważają, paradoksalną rolą płytek krwi. Coraz więcej dowodów potwierdza pogląd, że płytki krwi przenoszą i uwalniają wiele czynników, które mogą zmniejszać, a nie sprzyjać uszkodzeniu. Podczas gdy szkodliwą rolę płytek krwi przypisuje się głównie ich działaniu wewnątrznaczyniowemu, w działaniu ochronnym płytek krwi pośredniczą głównie czynniki przez nie wydzielane a oddziałujące na

kardiomiocyty. Uwalniane po aktywacji takie czynniki jak cytokiny, chemeryna, sfingozyno-1-fosforan (S1P) i czynnik aktywujący płytki krwi, wpływają na funkcje kardiomiocytów co zostało szczegółowo przedstawione przez Autorkę w obszernym wstępie rozprawy. Wśród tych czynników nie wspomniała jednak o przenoszonych przez płytki cząsteczkach mikroRNA (miRNA-199a, miRNA-21, miRNA-15, miRNA-145), o których wiadomo, że wywierają korzystny wpływ na reperfuzyjne uszkodzenia serca. Inne cząsteczki miRNA-22, miRNA-185, miRNA-320b regulując ekspresję genów śródbłonna wspomagają regenerację serca. Dogłębne zrozumienie roli składników płytek krwi na wielkość zawału i kardioprotekcję w warunkach zawału mięśnia sercowego pozwoli odpowiednio ocenić potencjał antagonistów receptora P2Y<sub>12</sub> w ograniczaniu uszkodzeń serca. Można więc sobie wyobrazić, że podawanie antagonistów receptora P2Y<sub>12</sub> zakłóca ochronną rolę płytek krwi podczas zawału mięśnia sercowego.

W swoich badaniach, doktorantka zastosowała ciekawy model doświadczalny, który dość niefrasobliwie nazwała „chemicznym niedokrwieniem i reperfuzją”. Faktycznie był to model hipoksji chemicznej indukowanej cyjankiem sodu (NaCN). Anion cyjankowy jest inhibitorem oksydazy cytochromowej w łańcuchu transportu elektronów, co prowadzi do stanu, w którym komórki nie są zdolne do wytwarzania adenozyno-trifosforanu (ATP) w mechanizmie oksydacyjnej fosforylacji. W warunkach hipoksji indukowanej niedokrwieniem, komórki reagują na niskie stężenia tlenu za pomocą czynników indukowanych hipoksją (HIF), głównie HIF-1 $\alpha$  co w efekcie prowadzi do ekspresji wielu genów w tym zaangażowanych w beztlenowy metabolizm glukozy, Przede wszystkim dotyczy to ekspresji kinazy fosfoglicerynianowej-1 (PGK1). Co ciekawe, w piśmiennictwie egzystuje także alternatywny sposób indukcji hipoksji poprzez stosowanie mimetyków hipoksji takich jak chlorek kobaltu (CoCl<sub>2</sub>), który nie wpływa na ciśnienie tlenu, ale chemicznie stabilizują HIF-1 $\alpha$ .

Następnym etapem doświadczenia było usunięcie inhibitora (trzykrotne płukanie kardiomiocytów buforem PBS) i przywrócenia komórkom możliwości metabolizmu tlenowego co można nazwać reoksygenacją, ale nie reperfuzją. Reoksygenacja wydaje się bardziej adekwatnym określeniem, bowiem reperfuzja to coś więcej niż tylko dostarczanie tlenu.

Na pierwszy rzut oka, powyższe uwagi mogą sprawiać wrażenie, że mają jedynie charakter nomenklatury. W moim przekonaniu mają również znaczenie semantyczne odzwierciedlające relacji między wyrażeniami a rzeczywistością, do której się odnoszą i którą opisują. Problem ten nie dotyczy jedynie Doktorantki i Jej rozprawy. Pozwolę sobie w tym miejscu zacytować słowa

Cypriana Kamila Norwida. „*Ponad wszystkie wasze uroki, ty poezjo i ty wymowo, jeden wiecznie będzie wysoki – odpowiednie dać rzeczy słowo*”. Reasumując, pragnę zwrócić uwagę Doktorantki na fakt, iż stosowany model doświadczalny nie w pełni odzwierciedla stan kliniczny nazywany uszkodzeniem niedokrwienno-reperfuzyjnym. Z drugiej jednak strony, stosowany specyficzny model w pełni pozwalał na realizację nadrzędnego celu badań jakim było znalezienie odpowiedzi na następujące podstawowe pytania: **1)** Czy w warunkach doświadczenia płytki krwi ulegają aktywacji, w wyniku której uwalniają mikrocząstki (PMP)? **2)** Czy płytki krwi wpływają na zmianę ekspresji i aktywności MMP-2 oraz MMP-9 w kardiomiocytach? **3)** Czy płytki krwi wywierają efekt ochronny na kardiomiocyty poddane chemicznej hipoksji i reoksygenacji ?

W toku prowadzonych analiz oceniono: markery aktywacji płytek krwi i PMP (cytometria przepływowa), aktywność MMP-2 i MMP-9 (zymografia żelatynowa), stężenie MMP-2 (ELISA), ekspresję mRNA *MMP-2* i *MMP-9* (real-time PCR), aktywność dehydrogenazy mleczanowej (LDH), aktywność metaboliczną kardiomiocytów oraz ekspresję tkankową iNOS (mikroskopia fluorescencyjna). Wszystkie procedury analityczne zostały precyzyjnie opisane w dziale Materiały i Metody. Świadczy to o bardzo dobrym warsztacie analitycznym Doktorantki i stanowi rękojmię otrzymania wiarygodnych wyników. Uzyskane wyniki zostały poddane szczegółowej analizie statystycznej.

Autorka wykazała, że w danych warunkach doświadczalnych dochodzi do wyższej ekspresji wszystkich badanych markerów aktywacji płytek krwi. Zaobserwowała również zwiększenie ekspresji CD61 na powierzchni mikrocząstek pochodzenia płytkowego zależne od czasu trwania hipoksji. Proces niedotlenienia i reoksygenacji indukował wyższą aktywność proMMP-2 i MMP-2 w płytkach krwi, natomiast nie wpływał na aktywność MMP-9. Dodatkowo stężenie MMP-2 w płytkach krwi korelowało ujemnie z aktywnością MMP-2 w przestrzeni pozakomórkowej, co stanowi pośredni dowód na pochłanianie tej metaloproteiny przez płytki. Warunki doświadczenia nie miały wpływu na aktywność metaloproteinaz macierzy, jednak czas trwania niedokrwienia istotnie zwiększał aktywność MMP-9 w kardiomiocytach. Kardiomiocyty skontaktowane z płytkami krwi wykazywały tendencję do wyższej aktywności proMMP-2 i MMP-2. W przestrzeni pozakomórkowej obserwowano obniżenie aktywności MMP-2 po etapie hipoksji, natomiast liniowy wzrost aktywności MMP-9 wraz z czasem jej trwania sugeruje, iż warunki te wpływają odmiennie na aktywność i uwalnianie tych metaloproteinaz. Podobne obserwacje uzyskano na etapie reoksygenacji. Porównanie aktywności MMP na dwóch etapach doświadczenia wskazuje na dalsze uwalnianie proMMP-2 w czasie reoksygenacji. W obecności płytek krwi

obserwowano obniżoną aktywność MMP-2 i MMP-9 w przestrzeni pozakomórkowej, co zdaje się potwierdzać przypuszczenie, że jest to spowodowane pochłanianiem metaloproteinaz przez płytki lub zmniejszeniem ich uwalnianie z kardiomiocytów. Tendencja do niższej ekspresji genu *MMP-2* w kardiomiocytach skontaktowanych z płytkami sugeruje wpływ płytek krwi na poziomie transkrypcji. Natomiast ujemna korelacja ekspresji genów metaloproteinaz macierzy w płytkach krwi z ich aktywnością w płytkach, pośrednio potwierdza hipotezę dotyczącą pochłaniania przez płytki. Zaobserwowano także, iż obecność płytek wpływała na zwiększenie aktywności LDH w przestrzeni pozakomórkowej, co sugeruje, że płytki krwi mogą być źródłem tego enzymu.

Niezwykle istotną jest poczyniona przez Doktorantkę obserwacja dotycząca ekspresji białka indukowalnej formy syntazy tlenku azotu (iNOS). Wykazała, że w warunkach doświadczenia dochodzi do znamienego wzrostu ekspresji białka iNOS w kardiomiocytach. We wcześniejszych badaniach Kiang i wsp. [*Molecular and Cellular Biochemistry* **254**: 211–216, 2003] wykazali, że indukowana NaCN hipoksja zwiększa ekspresję mRNA iNOS w ludzkich komórkach nabłonka jelitowego T84 i limfocytach T Jurkat. W przeciwieństwie, jak wykazała Doktorantka, w obecności płytek krwi dochodzi do obniżenia ekspresji białka iNOS w kardiomiocytach w warunkach przedłużonej do 25 min indukowanej cyjankiem hipoksji. Wyniki tych badań Autorka skwitowała bardzo ogólnikową supozycją, że „zahamowanie syntezy tkankowej iNOS jako potencjalnego źródła cytotoksyczności stanowi potencjalny mechanizm kardioprotekcji”. Tymczasem wydaje się, że hamowanie ekspresji białka iNOS zachodzi na poziomie po transkrypcyjnym i prawdopodobnie polega na hamowaniu translacji przez cząsteczki niekodującego RNA zawarte w mikrocząstkach pochodzenia płytkowego powstających w warunkach hipoksji.

Wszystkie uzyskane wyniki zostały szczegółowo omówione w szerokiej dyskusji skierowanej głównie na kardioprotekcyjne właściwości krwinek płytkowych i prawdopodobne mechanizmy działania. Dyskusja przeprowadzona jest w oparciu o bogatą literaturę co świadczy o znakomitym teoretycznym przygotowaniu Autorki a także o umiejętności krytycznej oceny własnych wyników i danych z piśmiennictwa. Dostrzegam jednak, brak odniesienia się Autorki do pewnych ograniczeń wynikających z niepełnego odzwierciedlenia stosowanego modelu doświadczalnego warunków klinicznych niedokrwienia i reperfuzji.

Rozprawę wieńczą cztery wnioski, wynikające bezpośrednio z prezentowanych wyników badań. Podstawowym efektem jest wykazanie, iż w stosowanych warunkach doświadczalnych dochodzi do aktywacji płytek i powstawania płytkowych mikrocząstek, które najprawdopodobniej są odpowiedzialne za obserwowane efekty, przede wszystkim w regulację ekspresji, translacji

i uwalniania metaloproteinaz macierzy. Autorka zwraca także uwagę, że zwiększenie aktywności metabolicznej kardiomiocytów pod wpływem płytek krwi oraz uwalnianych mikrocząstek a także obniżona synteza iNOS, będącego źródłem toksycznego nadtlenoazotynu, stanowią podstawowe elementy mechanizmów ochrony kardiomiocytów. Wnioski są bardzo ostrożne i znajdują potwierdzenie w wynikach przeprowadzonych badań. Świadczy to z jednej strony o krytycyzmie Doktorantki a z drugiej o świadomości, że niektóre z nich wymagają dalszych, pogłębionych badań.

Przedstawione w rozprawie Pani mgr Korneli Hałucha wyniki wnoszą znaczący wkład w zrozumienie zjawisk zachodzących podczas hipoksji i zawierają istotny element nowości naukowej. Na szczególne podkreślenie zasługuje również ogromny potencjał inspirujący do dalszych badań w szczególności wpływu leków przeciwplatek, co może się przyczynić do ewentualnej zmiany paradygmatów farmakoterapii w ostrym zawale mięśnia sercowego.

Reasumując uważam, że rozprawa doktorska, autorstwa mgr Korneli Hałucha spełnia warunki określone w art.187 ust 1 i 2 ustawy Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018 r., poz 1668 ze zm.). Wnoszę do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauki Farmaceutyczne Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu o dopuszczenie rozprawy mgr Korneli Hałucha do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia naukowego doktora.



Prof. dr hab. Dariusz Sitkiewicz

Warszawa, dnia 15 lipca 2024 r.