



Śląski Uniwersytet
Medyczny w Katowicach

Uniwersytet Medyczny
we Wrocławiu



RPW/13400/2024 P
Data: 2024-07-26

211-BF 4100. 3. 2024
Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu
BIURO
RADY DYSCYPLINY NAUKI FARMACEUTYCZNE
Podpis *B. Kornele* 26.07.2024

Sosnowiec / 24.07.2024 r.

RECENZJA

rozprawy na stopień naukowy doktora
mgr Kornelii Hałucha

**Katedra Analityki Medycznej
Wydział Farmaceutyczny
Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu**

Tytuł pracy: **Wpływ płytek krwi i mikrocząsteczek pochodzenia płytkowego na uszkodzenie kardiomiocytów w warunkach chemicznego niedokrwienia i reperfuzji**

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

Katedra i Zakład Chemii
Klinicznej i Diagnostyki
Laboratoryjnej

Wydział Nauk
Farmaceutycznych
w Sosnowcu

41-200 Sosnowiec
ul. Jedności 8
www.sum.edu.pl

Profesor SUM naukowo-badawczy
dr hab. n. med. Katarzyna Winsz-Szczotka
winsz@sum.edu.pl

W XXI wieku choroby sercowo-naczyniowe (CVD, *cardiovascular disease*) stanowią jedną z głównych przyczyn rozwoju niepełnosprawności u ludzi, a choroba niedokrwienna serca jest istotną przyczyną przedwczesnej śmierci chorych. Powyższe wynika zarówno z nieoptymalnego wdrażania strategii profilaktycznych, jak również z obecności u pacjentów „niekontrolowanych” czynników ryzyka CVD, w tym – nadciśnienia, dyslipidemii czy zaburzeń równowagi pro-anty koagulacyjnej. Niezależnie od etiopatogenetycznego mechanizmu uszkodzenia kardiomiocytów spowodowanych przez CVD, ich efektem jest śmierć komórek. Priorytetem staje się zatem opracowanie, opartych na dowodach naukowych, wytycznych dotyczących diagnostyki i leczenia omawianych schorzeń. Z uwagi na powyższe, badania mające na celu wykazanie ewentualnego efektu kardioprotekcyjnego płytek krwi i poznanie mechanizmu tego zjawiska, mogących przyczynić się do modyfikacji terapii CVD, podjęte w pracy noszącej tytuł: „Wpływ płytek krwi i mikrocząsteczek pochodzenia płytkowego na uszkodzenie kardiomiocytów w warunkach chemicznego niedokrwienia i reperfuzji”, przez Panią mgr Kornelię Hałuchę, pod opieką Pani dr hab. n. farm. Iwony Bil-Luli, prof. uczelni, uważam za niezwykle interesujące, zarówno ze względów naukowych, jak i potencjalnie użytecznych w praktyce klinicznej.

Rozprawa doktorska mgr Kornelii Hałucha, została przygotowana w formie monografii naukowej, o typowym układzie dla dysertacji doktorskich. Autorka zachowała właściwą proporcję poszczególnych jej części, które są koherentne i zgodne z ich tytułami. Praca, której treść odpowiada tytułowi, obejmuje 206 stron wydruku, łącznie z tabelami (7), wykresami (66) i rycinami (26), oraz bibliografią będącą wykazem w pełni wykorzystanych i przytoczonych 290 pozycji literaturowych o tematyce związanej z treścią pracy (brak odnośników literaturowych po cytowaniu nazwisk autorów prac, np. str. 27, 28, 155, 158 i inne). Rozprawę dopełniają streszczenia w języku polskim i angielskim, wykaz skrótów (brak wyjaśnień w teście niektórych skrótów, np. MMP na str. 28, real-time PCR na str. 64, czy HIF na str. 158), oraz opis naukowej sylwetki Doktorantki. Projekt badań uzyskał pozytywną opinię Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym we Wrocławiu (numer KB-421/2021).

W 29-stronnicowym rozdziale Wstęp Doktorantka niezwykle szczegółowo przedstawia aktualną wiedzę dotyczącą trzech głównych zagadnień związanych z:

- zawałem mięśnia sercowego (MI, *myocardial infarction*) oraz uszkodzeniami niedokrwienno-reperfuzyjnymi (IRI, *ischemia-reperfusion injury*) tego narządu,
- płytkami krwi oraz mikrocząsteczkami pochodzenia płytkowego (PMP, *platelet-derived microparticles*) wraz z ich rolą w patofizjologii MI i IRI,

SEKRETARIAT
tel.: (+48 32) 364 11 50
fax: (+48 32) 364 11 57
chem_klin@sum.edu.pl

- metaloproteinazami macierzy pozakomórkowej (MMPs, *matrix metalloproteinases*) ze szczególnym uwzględnieniem udziału MMP-2 i MMP-9 w uszkodzeniu niedokrwienno-reperfuzyjnym serca.

Obszerny wstęp, będący wartościowym elementem rozprawy, zasługujący na upowszechnienie w formie pracy poglądowej, stanowi doskonałe wprowadzenie do tematyki rozprawy doktorskiej. Ponadto, treść przedmiotowego rozdziału uzasadnia wybór celu badawczego pracy, którym było ustalenie funkcji płytek krwi w MI i IRI oraz poznanie ewentualnych mechanizmów wzajemnego oddziaływania płytek krwi i kardiomiocytów. Praca stanowi próbę odpowiedzi na pytania: czy w warunkach niedokrwienia i reperfuzji (I/R, ischemia/reperfusion) płytki krwi ulegają aktywacji, w wyniku której uwalniają PMP? • czy płytki krwi wpływają na zmianę ekspresji i aktywności MMP-2 oraz MMP-9 w kardiomiocytach? • czy płytki krwi wywierają efekt ochronny na kardiomiocyty poddane I/R?

Materiał do badań stanowiły płytki krwi wyizolowane od 20 zdrowych ochotników oraz komórki ludzkich kardiomiocytów (HCM, *human cardiac myocytes*). Badania stanowiące cel pracy przeprowadzono w grupie kontrolnej, tj. HCM, oraz w grupie badanej tj. HCM skontaktowane z płytkami krwi. Komórki poddano procedurze chemicznego niedokrwienia i reperfuzji, stosując zróżnicowane czasy trwania niedokrwienia (15, 20, 25 minut). Uprzejmie zapytuję Doktorantkę o zasady doboru wspomnianych, stosowanych przedziałów czasowych. Doktorantka poddała ocenie: markery aktywacji płytek krwi oraz ekspresję markerów aktywacji płytek krwi na powierzchni PMP, zmianę aktywności MMP-2 i MMP-9 w kardiomiocytach i płytkach krwi po I/R oraz w przestrzeni pozakomórkowej po etapie niedokrwienia i po etapie reperfuzji, wraz z ekspresją genów wymienionych MMPs w płytkach krwi i kardiomiocytach po I/R. Ponadto, pani magister sprawdziła jak obecność płytek krwi podczas I/R wpływała na uwalnianie dehydrogenazy mleczanowej (LDH, *lactate dehydrogenase*), aktywność metaboliczną kardiomiocytów oraz ekspresję indukowalnej syntazy tlenu azotu (iNOS, *inducible nitric oxide synthase*) w komórkach serca.

Autorka bardzo szczegółowo, w sposób umożliwiający odtworzenie opisała stosowane w pracy liczne metody badawcze, w tym – procedury izolacji płytek krwi, hodowli komórkowej, chemicznego niedokrwienia i reperfuzji (I/R), barwienia FDA/DAPI, immunofluorescencji, badania cytometrycznego płytek krwi i mikrocząsteczek pochodzenia płytkowego, trypsynizacji komórek HCM, homogenizacji, zymografii żelatynowej, oznaczania białka metodą Bradforda, izolacji RNA z płytek krwi i kardiomiocytów, odwrotnej transkrypcji, łańcuchowej reakcji polimerazy z analizą w czasie rzeczywistym (*real-time PCR, polymerase chain reaction*), ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*), jak i oceny aktywności dehydrogenazy mleczanowej. Jednakże znacznym wzbogaceniem i ułatwieniem dla czytelnika rozdziału Materiał i metody, byłoby wskazanie dla stosowanej metody badawczej jej celu, tj. ocenianego parametru. Uprzejmie zapytuję Doktorantkę, czy wszystkie – jakże liczne – badania wykonała samodzielnie?

Rezultaty analiz statystycznych uzyskanych wyników badań Doktorantka zebrała w licznych tabelach i zilustrowała graficznie na rycinach, co w znaczący sposób ułatwiło analizę kolejnego, jakże długiego, zawierającego wiele informacji, a jednocześnie przejrzystego, rozdziału Wyniki. Treść omawianej części rozprawy wskazuje, iż cel pracy doktorskiej został w pełni zrealizowany. Doktorantka dowiodła, że:

- dłuższy czas niedokrwienia istotnie wpływa na ekspresję aktywowanej glikoproteiny (GP) IIb-IIIa, P-selektyny, białka CD63 na powierzchni płytek krwi;
- ekspresja aktywowanej GP IIb-IIIa na powierzchni płytek krwi istotnie wzrasta w wyniku niedokrwienia (15 min) w warunkach reperfuzji w porównaniu do wielkości ekspresji stwierdzonej w warunkach tlenowych (50 min), oraz niedokrwienia (20 min) w warunkach reperfuzji (20 min) w porównaniu do wielkości ekspresji stwierdzonej w warunkach niedokrwienia (20 min);
- ekspresja P-selektyny oraz CD63 na powierzchni płytek krwi w warunkach tlenowych oraz w warunkach I/R nie ulega zmianie w stosowanych warunkach reakcyjnych;
- w warunkach niedokrwienia, niezależnie od czasu jego trwania, ekspresja CD61 (zamiennie stosowana w pracy nazwa CD61+ – należy ujednotlić) na powierzchni mikrocząsteczek pochodzenia płytkowego istotnie obniża się, zaś ekspresja powierzchniowa aktywowanej GP IIb-IIIa jest niższa jedynie po 15 minutach niedokrwienia;

- ✚ aktywność proMMP-2 w kardiomiocytach w warunkach niedokrwienia (25 min) i reperfuzji (20 min) istotnie obniża się, w porównaniu do kardiomiocytów inkubowanych w warunkach tlenowych. Podobnych zmian nie stwierdzono w analizie aktywności MMP-2 oraz MMP-9;
- ✚ aktywność proMMP-2, MMP-2 oraz MMP-9 w kardiomiocytach poddanych zmiennym warunkom I/R jest porównywalna do aktywności tych związków cechującej kardiomiocyty w warunkach tlenowych;
- ✚ aktywność proMMP-2 oraz MMP-2 lecz nie MMP-9 znamienne wzrasta w płytkach krwi poddanych procedurze niedokrwienia (odpowiednio: 25 min, 20 min) i reperfuzji (20 min) w porównaniu do płytek krwi inkubowanych w warunkach tlenowych. Na wykresach 24, 25 czy 46 znajdujemy czasy reperfuzji = 15 minut, stąd uprzejmie zapytuje Doktorantkę o celowość różnicowania wspomnianego czasu;
- ✚ obecność płytek krwi nie wpływała istotnie na aktywność proMMP-2, MMP-2 i MMP-9 w homogenatach kardiomiocytów w warunkach tlenowych oraz w warunkach I/R;
- ✚ aktywność proMMP-2 w roztworach pozakomórkowych zebranych po niedokrwieniu kardiomiocytów trwającym 15 i 20 minut znamienne obniża się, w porównaniu do ocenianej aktywności enzymatycznej w warunkach tlenowych. Pomimo iż, podobnych zmian nie stwierdzono w analizie aktywności MMP-2 oraz MMP-9, to wykazano związek aktywności MMP-9 w przestrzeni pozakomórkowej z czasem trwania niedokrwienia;
- ✚ w warunkach niedokrwienia, niezależnie od czasu jego trwania, aktywność proMMP-2 w roztworach pozakomórkowych zebranych po niedokrwieniu kardiomiocytów skontaktowanych z płytkami krwi istotnie obniża się, w porównaniu do warunków tlenowych. Podobnych zależności nie stwierdzono w przypadku MMP-2 i MMP-9;
- ✚ aktywność proMMP-2 w przestrzeni pozakomórkowej kardiomiocytów nie zmienia się w obecności płytek krwi i nie pozostaje w zależności od stosowanych warunków tlenowych, jak i niedokrwienia, niezależnie od czasu jego trwania. Natomiast, stan niedokrwienia (20 min) istotnie obniża aktywność MMP-9 w przestrzeni pozakomórkowej komórek grupy badanej (HCM+PLT);
- ✚ reperfuzja poprzedzona niedokrwieniem (niezależnie od czasu jego trwania) nie wpływa na aktywność proMMP-2 oraz MMP-9 w roztworach pozakomórkowych zebranych po niedokrwieniu kardiomiocytów zarówno tych z grupy kontrolnej, tak i komórek skontaktowanych z płytkami krwi, tj. grupy badanej;
- ✚ skontaktowanie kardiomiocytów z płytkami krwi przyczynia się zarówno do obniżenia aktywności proMMP-2 w przestrzeni pozakomórkowej w warunkach tlenowych oraz w warunkach niedokrwienia (20 min) i reperfuzji (20 min), jak i do obniżenia aktywności MMP-9 jedynie w warunkach tlenowych oraz warunkach niedokrwienia (25 min) i reperfuzji (20 min);
- ✚ całkowite stężenie MMP-2 w płytkach krwi w grupie badanej nie zmienia się w wyniku I/R i jest porównywalne do stężenia wykazanego w warunkach tlenowych;
- ✚ kardiomiocyty w warunkach niedokrwienia (15, 25 min) i reperfuzji (20 min) wykazują wzrost ekspresji genu MMP-2 w porównaniu do ekspresji wykazanej w kardiomiocytach utrzymywanych w warunkach tlenowych. Podobnych różnic nie stwierdzono w przypadku analizy ekspresji genu MMP-9;
- ✚ kardiomiocyty skontaktowane z płytkami krwi oraz same płytki krwi nie wykazują różnic w ekspresji genów MMP-2 i MMP-9 w stosowanych, zmiennych warunkach reakcji. Wyjątek stanowi wykazane istotne obniżenie ekspresji MMP-9 po I/R (20 min, 20 min) w porównaniu do warunków I/R (25 min, 20 min);
- ✚ ekspresja genu MMP-2 oraz MMP-9 kardiomiocytów nie zmienia się pod wpływem płytek krwi w warunkach tlenowych oraz w zmiennych warunkach I/R;
- ✚ czas niedokrwienia nie wpływa na aktywność LDH w buforach zebranych po etapie niedokrwienia w grupach kardiomiocytów zarówno skontaktowanych jak i nieskontaktowanych z płytkami krwi;
- ✚ aktywność LDH w buforach w warunkach tlenowych oraz niedokrwienia (20 min) była istotnie wyższa po skontaktowaniu kardiomiocytów z płytkami krwi w porównaniu do grupy kontrolnej;
- ✚ stężenie białka całkowitego w kardiomiocytach obu grup badanych oraz płytkach krwi nie zmienia się istotnie pod wpływem niedokrwienia;

- ✚ kardiomiocyty z grupy kontrolnej i badanej poddane I/R wykazują niższą aktywność metaboliczną, szczególnie w sytuacjach niedokrwienia (20, 25 min), w porównaniu do kardiomiocytów utrzymywanych w warunkach tlenowych;
- ✚ w warunkach tlenowych płytki krwi przyczyniają się do istotnego obniżenia aktywności metabolicznej kardiomiocytów, zaś w warunkach niedokrwienia (25 min) i reperfuzji (20 min) sprzyjają wzrostowi ocenianej aktywności;
- ✚ ekspresja iNOS w kardiomiocytach obu grup badanych nie ulega zmianom w warunkach I/R w porównaniu do warunków tlenowych;
- ✚ w warunkach tlenowych płytki krwi przyczyniają się do istotnego wzrostu ekspresji iNOS w kardiomiocytach, zaś w warunkach niedokrwienia (25 min) i reperfuzji (20 min) sprzyjają obniżeniu badanej ekspresji;
- ✚ istotne zależności występują pomiędzy analizowanymi zmiennymi, w tym pomiędzy:
 - ekspresją CD61 na powierzchni PMP a aktywnością metaboliczną kardiomiocytów oraz ekspresją genu MMP-2 w kardiomiocytach;
 - aktywnością proMMP-2 w kardiomiocytach a aktywnością proMMP-2 w przestrzeni pozakomórkowej po etapie reperfuzji;
 - stężeniem MMP-2 w płytkach krwi a aktywnością proMMP-2 w przestrzeni pozakomórkowej po etapie niedokrwienia i po etapie reperfuzji;
 - ekspresją MMP-2 w kardiomiocytach a aktywnością MMP-2 w kardiomiocytach w grupie kontrolnej;
 - ekspresją MMP-2 a aktywnością proMMP-2 oraz ekspresją MMP-9 a aktywnością MMP-9, a ponadto ekspresją MMP-2 a aktywnością MMP-2 w płytkach krwi;
 - aktywnością LDH w przestrzeni pozakomórkowej a aktywnością MMP-2 i MMP-9 w płytkach krwi;
 - aktywnością metaboliczną kardiomiocytów a aktywnością MMP-2 i MMP-9 w płytkach krwi.

Uzyskane wyniki badań Pani mgr Kornelia Hałucha przedyskutowała na stronicach kolejnego rozdziału tj. Dyskusja, który został przejrzyście zredagowany i podzielony na podrozdziały odpowiadające poszczególnym zadaniom badawczym dysertacji. Przedmiotowy rozdział otwiera przed czytelnikiem nowe przemyślenia i wnioski, stanowiąc dowód orientacji Doktorantki w tematyce związanej z przeprowadzonymi badaniami. Autorka dowiodła, iż cechuje się zdolnością splatania wyników własnych z opracowaniami naukowców zajmujących się podobnymi zagadnieniami, a tym samym potwierdziła posiadanie kompetencji do pracy naukowej.

Pracę zamykają cztery wnioski odnoszące się w większości do zakładanych celów oraz uzyskanych wyników. Jednakże, ostatni z wymienionych wydaje się być nadinterpretacją własnych rezultatów, choć przedyskutowanych, bowiem w pracy Doktorantka oceniała ekspresję białka iNOS nie zaś jego protekcyjne efekty działania w stosunku do kardiomiocytów.

Podsumowując, Pani mgr Kornelia Hałucha w pracy pt. Wpływ płytek krwi i mikrocząsteczek pochodzenia płytkowego na uszkodzenie kardiomiocytów w warunkach chemicznego niedokrwienia i reperfuzji, wykazała się szeroką wiedzą teoretyczną w podjętym temacie i umiejętnością samodzielnego prowadzenia badań naukowych opartych na szerokim wachlarzu nowoczesnych technik badawczych. A występujące w pracy błędy stylistyczne, interpunkcyjne i edytorskie są sporadyczne i zapewne przypadkowe.

Jednocześnie potwierdzam, że recenzowana rozprawa doktorska, autorstwa Pani mgr Kornelii Hałucha spełnia warunki określone w art. 187 ust. 1 i 2 ustawy Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2018 poz. 1668ze zm.). Z pełnym przekonaniem przedkładam Szanownym Członkom Rady Dyscypliny Nauki Farmaceutyczne Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu wniosek o dopuszczenie Pani Magister do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia naukowego doktora.

Biorąc pod uwagę dojrzałość naukową Doktorantki, jak również wysokie wartości merytoryczne ocenianej przeze mnie dysertacji, w tym nowatorski charakter wyników badań otrzymanych w oparciu o nowoczesny warsztat badawczy, wnioskuję o wyróżnienie pracy Pani mgr Kornelii Hałucha.

24.07.24.

