

dr Marcin Różalski

AUTOREFERAT

Zakład Zaburzeń Krzepnięcia Krwi
Katedra Nauk Biomedycznych
Wydział Nauk o Zdrowiu
Uniwersytet Medyczny w Łodzi

Łódź, maj 2015

Spis treści

ŻYCIORYS	3
OMÓWIENIE WSKAZANEGO OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO	5
Publikacje stanowiące osiągnięcie naukowe	5
Dane bibliometryczne osiągnięcia naukowego	7
Omówienie celu naukowego	8
OMÓWIENIE POZOSTAŁYCH OSIĄGNIĘĆ NAUKOWO-BADAWCZYCH	15
Autorstwo i współautorstwo publikacji naukowych	15
Udział w zjazdach naukowych	15
Zgłoszenia patentowe	16
Udział w projektach badawczych	16
Nagrody naukowe	18
Przebieg kariery naukowej i zainteresowania badawcze	19
OMÓWIENIE DZIAŁALNOŚCI DYDAKTYCZNEJ I ORGANIZACYJNEJ	21
Omówienie działalności i osiągnięć dydaktycznych	21
Omówienie działalności i osiągnięć organizacyjnych	21

ŻYCIORYS

1. Imię i nazwisko

Marcin Różalski

2. Posiadane dyplomy i stopnie naukowe

2001 r. doktor nauk medycznych (w zakresie biologii medycznej)

Wydział Lekarski

Akademia Medyczna w Łodzi

Tytuł rozprawy: *„Znaczenie polimorfizmu P1A1/A2 glikoproteiny GPIIIa w odpowiedzi płytek na działanie czynników aktywujących oraz antagonistów receptora dla fibrynogenu oraz w kształtowaniu reaktywności płytek w wybranych stanach klinicznych”*

Promotor: prof. dr hab. Cezary Watała

Rozprawa wyróżniona nagrodą indywidualną Prezesa Rady Ministrów w 2002 r.

1995 r. magister biologii (specjalność: biologia molekularna)

Wydział Biologii i Nauk o Ziemi

Uniwersytet Łódzki

Tytuł pracy magisterskiej: *„Ekspresja białka p65 w aktywnie proliferujących komórkach nabłonkowych”*

Promotor: prof. dr hab. Zofia Kiliańska

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych.

- 2004 - obecnie adiunkt
Zakład Zaburzeń Krzepnięcia Krwi
Katedra Nauk Biomedycznych
Uniwersytet Medyczny w Łodzi
- 2002 - 2004 asystent
Zakład Zaburzeń Krzepnięcia Krwi
Katedra Diagnostyki Laboratoryjnej
Uniwersytet Medyczny w Łodzi
- 1998 - 2002 młodszy asystent
Samodzielna Pracownia Zaburzeń Krzepnięcia Krwi
Państwowy Szpital Kliniczny nr 1 im. N. Barlickiego
Łódź
- 1996 - 1998 starszy referent inżynieryjno-techniczny
Pracownia Biologii Molekularnej
II Klinika Chorób Dzieci
Instytut Pediatrii
Akademia Medyczna w Łodzi
- 1995 - 1996 młodszy asystent
Pracownia Biologii Molekularnej
Państwowy Szpital Kliniczny nr 4 im. M. Konopnickiej
Łódź

OMÓWIENIE WSKAZANEGO OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO

4. Osiągnięcie naukowe wynikające z art. 16, ust. 2 z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.).

A) Tytuł osiągnięcia naukowego

Osiągnięciem jest cykl 7 publikacji naukowych związanych tematycznie:

„Profile aktywacji i reaktywność płytek krwi oraz ich wrażliwość na działanie związków o aktywności przeciwplatekowej w wybranych układach modelowych i stanach klinicznych”

B) Autor/autorzy, tytuł/tytuły publikacji, rok wydania, nazwa czasopisma:

[1] Różalski M, Boncler M, Luzak B, Watała C.

Genetic factors underlying differentiated blood platelet sensitivity to inhibitors. Pharmacol Rep. 2005; 57(1):1-13 (publikacja przeglądowa).

IF 1,029, MNiSW=10, Cytowań 22

Wkład habilitanta polegał na opracowaniu pomysłu i koncepcji artykułu, zebraniu literatury, dominującym udziale w redakcji i korekcie manuskryptu, krytycznej dyskusji manuskryptu ze współpracownikami. Łączny wkład habilitanta można oszacować na 70%.

[2] Różalski M, Nocun M, Watała C.

Adenosine diphosphate receptors on blood platelets - new potential targets for antiplatelet therapy.

Acta Biochim Pol. 2005; 52(2):411-5. (publikacja przeglądowa).

IF 1,863; MNiSW 10, Cytowań 16

Wkład habilitanta polegał na opracowaniu pomysłu i koncepcji artykułu, przygotowaniu manuskryptu, dominującym udziale w korekcie manuskryptu, krytycznej dyskusji manuskryptu ze współpracownikami. Łączny wkład habilitanta można oszacować na 80%.

[3] Łukasik M, Różalski M, Luzak B, Michalak S, Kozubski W, Watała C.

Platelet activation and reactivity in the convalescent phase of ischaemic stroke.

Thromb Haemost. 2010, 103(3):644-50. (publikacja oryginalna).

IF 4,701; MNiSW 32; Cytowań 16.

Wkład habilitanta polegał na opracowaniu metodyki, zaplanowaniu i wykonaniu eksperymentów przy użyciu metody cytometrii przepływowej, analizie i interpretacji danych cytometrycznych, udziale w opracowaniu pierwszej wersji manuskryptu (w 50%), korekcie manuskryptu, krytycznej dyskusji całego manuskryptu ze współpracownikami. Łączny wkład habilitanta można oszacować na 40%.

[4] Łukasik M, Różalski M, Luzak B, Michalak M, Ambrosius W, Watała C, Kozubski W.

Enhanced platelet-derived microparticle formation is associated with carotid atherosclerosis in convalescent stroke patients.

Platelets. 2013;24(1):63-70. (publikacja oryginalna).

IF 2,627; MNiSW 25. Cytowań 3

Wkład habilitanta polegał na opracowaniu metodyki, zaplanowaniu i wykonaniu eksperymentów przy użyciu metody cytometrii przepływowej, analizie i interpretacji danych cytometrycznych, udziale w opracowaniu pierwszej wersji manuskryptu (w 50%), korekcie manuskryptu, krytycznej dyskusji całego manuskryptu ze współpracownikami. Łączny wkład habilitanta można oszacować na 40%.

[5] Watała C, Różalski M.

Pharmacological modulation of platelet reactivity in diabetes mellitus and obesity. W: Obesity and related comorbidities. Red. Drzewoski J. Polish Society of Metabolic Diseases, 2010, Łódź. (rozdział w książce).

IF brak; MNiSW 7; Cytowań brak.

Wkład habilitanta polegał na zaplanowaniu i opracowaniu konspektu rozdziału, wyszukiwaniu i doborze literatury, udziale w opracowaniu, redakcji i korekcie manuskryptu. Łączny wkład habilitanta można oszacować na 60%.

[6] Różalski M, Watała C, Golanski J.

Various laboratory protocols for measuring thromboxane A2 generation to detect the effectiveness of acetylsalicylic acid therapy: a comparative study.

Blood Coagul Fibrinolysis. 2014 25(1):46-51(publikacja oryginalna).

IF₂₀₁₃ 1,380; MNiSW 15. Cytowań brak.

Wkład habilitanta polegał na opracowaniu koncepcji badań, wykonaniu całości eksperymentów, dominującym udziale w przygotowaniu, redakcji i korekcie manuskryptu, krytycznej dyskusji całego manuskryptu ze współpracownikami. Łączny wkład habilitanta można oszacować na 80%.

[7] Różalski M, Kassassir H, Siewiera K, Klepacka A, Sychowski R, Watała C.

Platelet activation patterns are different in mouse models of diabetes and chronic inhibition of nitric oxide synthesis. *Thromb Res.* 2014, 133(6):1097-104 (publikacja oryginalna).

IF 2,427; MNiSW 25. Cytowań brak.

Wkład habilitanta polegał na dominującym udziale w opracowaniu koncepcji pracy i w zaplanowaniu eksperymentów, dominującym udziale w przygotowaniu, redakcji i korekcie manuskryptu, krytycznej dyskusji całego manuskryptu ze współpracownikami. Łączny wkład habilitanta można oszacować na 60%.

C) Dane bibliometryczne osiągnięcia habilitacyjnego:

Łączny IF (z roku publikacji) prac stanowiących osiągnięcie **14,027**.

Łączna punktacja MNiSW z roku publikacji prac stanowiących osiągnięcie **124** (według aktualnej punktacji MNiSW 152).

Łączna liczba cytowań prac stanowiących osiągnięcie **57**.

D) Omówienie celu naukowego

Płytki krwi są niewielkimi, bezjądrzastymi komórkami biorącymi udział w procesie krzepnięcia krwi. Podczas uszkodzenia naczynia krwionośnego ma miejsce uszkodzenie warstwy komórek śródbłonna wyściełającej łożysko naczyniowe, w konsekwencji dochodzi do interakcji płytek z białkami adhezyjnymi, takimi jak czynnik von Willebranda i kolagen. Oddziaływanie to prowadzi do adhezji płytek i ich aktywacji, uwalniania zawartości ziarnistości wewnątrzpłytkowych oraz zmiany kształtu płytek. Poza tymi przejawami wczesnej odpowiedzi płytek, określanymi jako hemostaza pierwotna, płytki odgrywają także kluczową rolę w procesie aktywacji czynników krzepnięcia krwi, która odbywa się na powierzchni błon komórkowych płytek krwi.

Co oczywiste, prawidłowa odpowiedź płytek krwi jest niezbędną składową procesu krzepnięcia krwi, z drugiej strony jednak nadmierna reaktywność płytek prowadzi do fenotypu prozakrzepowego. Płytki krwi można uważać zatem za kluczowy komponent mechanizmu hemostazy fizjologicznej ale z kolei zaburzenia funkcji płytek stanowią istotny czynnik ryzyka zakrzepicy. Wiadomo, że zakrzepy w układzie tętniczym są pochodzenia głównie płytkowego i tworzą się przeważnie w obrębie blaszki miażdżycowej oraz przy zaburzonym przepływie krwi. W świetle powyższych faktów, stosowanie leków przeciwplatek w celu ograniczenia zakrzepicy tętniczej jest naturalną strategią terapeutyczną. Od wielu lat, najczęściej stosowanym lekiem przeciwplatekowym jest kwas acetylosalicylowy (aspiryna). Pomimo, że jest to lek o udowodnionym działaniu klinicznym i stosunkowo ograniczonych efektach ubocznych, należy stwierdzić, że jego działanie przeciwplatekowe jest ograniczone. Z tego względu, w dalszym ciągu trwają intensywne poszukiwania i badania leków przeciwplatekowych nowej generacji. Spośród dostępnych inhibitorów zakrzepicy pochodzenia płytkowego, obejmujących blokery adhezji płytek, inhibitory swoistych interakcji agonista-receptor (antagoniści receptora dla trombin, antagoniści receptora dla fibrynogenu, antagoniści receptora dla tromboksanu A_2 , blokery receptorów dla ADP) czy inhibitorów syntazy tromboksanowej i metabolizmu kwasu arachidonowego, jedynie antagoniści receptorów płytkowych pozwalają na kompleksowe blokowanie zarówno początkowych, jak i końcowych etapów aktywacji, adhezji i agregacji płytek.

Aspekt dużej zmienności osobniczej u ludzi w przypadku odpowiedzi płytek na działanie czynników aktywujących oraz wrażliwości na działanie inhibitorów stanowi zauważalny problem w piśmiennictwie i stał się tematem publikacji przeglądowej [1], wchodzącej w skład przedmiotowego osiągnięcia habilitacyjnego. Generalnie, zjawisko dość dużej zmienności osobniczej dotyczącej aktywacji płytek we krwi krążącej oraz reaktywności mierzonej *in vitro* jest obserwowane zarówno u zdrowych dawców, jak i u chorych z zakrzepicą tętniczą. Zmienność osobnicza wynika z wpływu czynników środowiskowych oraz ma podłoże genetyczne. Wspomniana publikacja przeglądowa koncentruje się głównie na wpływie czynników genetycznych. Co istotne, czynniki genetyczne wydają się być istotnym czynnikiem wpływającym nie tylko na odpowiedź płytek na aktywujące działanie agonistów ale modulują także stopień inhibicji płytek krwi przez leki przeciwplatekcyjne. Istnieją prace sugerujące, że polimorfizmy genetyczne w obrębie genów kodujących glikoproteiny mogą stanowić czynniki ryzyka zakrzepicy tętniczej. Pomimo pewnych rozbieżności i nie do końca spójnych wyników, wydaje się, że w piśmiennictwie przeważa pogląd, iż podwyższone ryzyko zakrzepicy może mieć związek z występowaniem allelu PI^{A2} integryny β_3 , wariantu $GPIb\alpha$ Met^{145} oraz haplotypu $GPIb\alpha^{-5}C$, a także haplotypu (^{807}T) integryny α_2 . W artykule [1] omówiono dostępne dane literaturowe dotyczące roli wymienionych wyżej polimorfizmów w kształtowaniu funkcji płytek krwi i modulowaniu wrażliwości płytek na inhibitory. Publikacja ta koncentruje się na związku polimorfizmu $PI^{A1/A2}$ $GPIIIa$ i wrażliwości (lub oporności) płytek na działanie aspiryny oraz antagonistów receptora $GPIIb-IIIa$. Ponadto, przedstawiono przegląd i dyskusję literatury traktującej o potencjalnym znaczeniu polimorfizmu $^{807}C/T$ ($GPIa$), różnych wariantów polimorficznych $GPIb$ oraz polimorfizmów w obrębie genów płytkowych receptorów dla ADP ($P2Y_1$ i $P2Y_{12}$) w kontekście kształtowania wrażliwości płytek na inhibitory.

Płytki ulegają aktywacji pod wpływem wielu różnych agonistów, takich jak: trombina, kolagen, tromboksan czy adenylozynytrifosforan (ADP). Pomimo, że ADP jest uważany za stosunkowo słaby aktywator płytek krwi, pozostaje ważnym mediatorem aktywacji płytek wywoływanej początkowo przez działanie innych agonistów, które prowadzą do obfitego uwalniania ADP z ziarnistości gęstych, gdzie agonista ten występuje w stężeniach molowych. Na drodze tego mechanizmu, działanie ADP nosi więc znamiona dodatniego sprzężenia zwrotnego,

napędzającego agregację płytek, prowadzącą w konsekwencji do powstania czopu hemostatycznego. Co więcej, ADP działa w sposób synergistyczny, wzmagając działanie innych, często słabych agonistów, takich jak serotonina, adrenalina czy chemokiny. W błonach płytek krwi występują dwa typy receptorów P2Y dla ADP: P2Y₁ i P2Y₁₂. Agregacja płytek zależna od ADP jest inicjowana przez receptor P2Y₁, podczas gdy receptor P2Y₁₂ odpowiada za wzmocnienie sygnału aktywującego i uruchamia reakcję uwalniania ziarnistości. Stymulacja P2Y₁₂ jest także niezbędna dla całkowitej aktywacji glikoprotein GPIIb-IIIa and GPIa-IIa zależnej od ADP i dalszej stabilizacji agregatów płytkowych. Kluczowa rola jaką pełni receptor P2Y₁₂ w biologii płytek, sprawia, że receptor ten jest celem strategii terapeutycznych zmierzających do opracowania nowych leków przeciwplatek. W publikacji przeglądowej [2], omówiono literaturę naukową dotyczącą zagadnień biologii i farmakologii poszczególnych klas receptorów purynergicznym obecnych na płytkach krwi. Szczególną uwagę poświęcono receptorom ADP w kontekście ich antagonistów, w tym nowosyntezowanym blokerom o potencjalnym zastosowaniu klinicznym.

W aktualnych wytycznych diagnostycznych i klinicznych nie ma obligatoryjnych zaleceń wskazujących na konieczność monitorowania leczenia przeciwplatekowego. Z drugiej strony, istnieje szereg badań, które wykazały, że resztkowa reaktywność płytek (*residual platelet reactivity* - RPR), mierzona za pomocą licznych testów funkcji płytek jest skorelowana ze zwiększoną częstością niekorzystnych epizodów klinicznych. Wydaje się zatem, że istnieje potrzeba opracowania wiarygodnego i stosunkowo prostego testu laboratoryjnego umożliwiającego ocenę klinicznej skuteczności terapii przeciwplatekowej, w zależności od zastosowanej dawki danego leku i, w konsekwencji umożliwiającej wykrycie pacjentów z RPR. W licznych badaniach *in vitro* i *ex vivo* podejmowano próby opracowania metodyki do monitorowania leczenia za pomocą ASA i wiarygodnej oceny RPR. W dalszym ciągu jednak brak jest konsensusu i wskazań uniwersalnych kryteriów metodologicznych do wykrywania oporności na leki przeciwplatekowe. Z tego względu, celem badań opisanych w publikacji oryginalnej [6] była weryfikacja eksperymentalna i porównanie pięciu protokołów laboratoryjnych do oznaczania generacji tromboksanu A₂ (TXA₂) w osoczu jako metody monitorowania leczenia za pomocą ASA. Badania prowadzono na zdrowych ochotnikach którzy przyjmowali ASA w dawce 150 mg/dobę przez 10 dni, a następnie dawkę 75 mg/dobę przez kolejne 10 dni. Testowano 5 procedur generacji TXA₂: Protokół 1: bazowe

oznaczenie TXB₂ w osoczu; Protokół 2 i Protokół 3: statyczna generacja TXA₂ we krwi pobranej na antykoagulant (odpowiednio, godzinna inkubacja w temp. pokojowej lub w 37°C); Protokół 4: dynamiczna generacja TXA₂ we krwi pobranej na antykoagulant (1 godzina na kołowym mieszadle hematologicznym); Protokół 5: generacja TXA₂ we krwi bez dodatku antykoagulantu (generacja TXA₂ w surowicy). Ponadto, rejestrowano agregację płytek we krwi pełnej, jako agonistów stosując kwas arachidonowy, kolagen i ADP. Wykazano, że w przypadku stosowania wszystkich badanych protokołów, przyjmowanie ASA prowadzi do obniżonej generacji tromboksanu. Jednakże tylko w przypadku procedury generacji TXA₂ w surowicy zaobserwowano dyskryminację pomiędzy podawanymi dawkami ASA. Co więcej, najsilniejsze i istotne statystycznie korelacje stwierdzono pomiędzy generacją TXA₂ w surowicy i parametrami agregacji indukowanej kwasem arachidonowym. Podsumowując, wyniki opublikowane w pracy [6] dowodzą, że generacja TXA₂ w surowicy wydaje się być najlepszym protokołem laboratoryjnym do monitorowania skuteczności kwasu acetylosalicylowego, jeśli chodzi o procedury bazujące na markerach metabolizmu prostanoidów we krwi.

Cukrzyca typu 2 (*diabetes mellitus* - DM) jest chorobą przewlekłą, której towarzyszy podwyższone ryzyko incydentów zakrzepowych mogących prowadzić do stanów klinicznych zagrażających życiu, takich jak zawał mięśnia sercowego czy udar mózgu. Dla DM charakterystyczne jest występowanie insulinooporności i dyslipidemii, które to czynniki przyczyniają się do zmienionej funkcji płytek krwi. Generalnie, u chorych na cukrzycę płytki są hiperreaktywne, odpowiadając nawet na podprogowe stężenia agonistów, przez to szybciej się „zużywają” stając się później mniej wrażliwe, co prowadzi do nasilonej trombopoezy (przekładającej się na podwyższone miano płytek) oraz uwalniania nowej puli nadreaktywnych płytek, posiadających także większe rozmiary. W rozdziale w książce [5], przedstawiono obszerny przegląd literatury dotyczącej zmian funkcji płytek krwi w cukrzycy typu 2 i otyłości, ze szczególnym uwzględnieniem leczenia farmakologicznego za pomocą szeroko stosowanych w klinice leków przeciwplatek, takich jak aspiryna, tiklopidyna, kłopidogrel oraz antagoniści receptora dla fibrynogenu. Analiza piśmiennictwa wskazuje na coraz bardziej rozpowszechniony pogląd, że z uwagi na fakt, iż leczenie jedynie za pomocą jednego z wyżej wymienionych leków nie jest w pełni skuteczne u chorych na cukrzycę i/lub ludzi z otyłością, wskazane jest

stosowanie terapii skojarzonej, czyli np. zastosowanie aspiryny wraz z blokerem purynoreceptora lub antagonistą GPIIb-IIIa.

Zagadnieniu zmienionej funkcji płytek w cukrzycy poświęcona jest również publikacja oryginalna [7], w której przedstawiono wyniki badań prowadzonych na modelu zwierzęcym cukrzycy. Mimo, że istnieje kilka zwierzęcych modeli doświadczalnych DM, stosunkowo niewiele wiadomo o funkcji płytek w tych modelach. Celem pracy [7] było zatem scharakteryzowanie i porównanie reaktywności i aktywacji płytek u myszy db/db (mysi model cukrzycy) oraz u myszy, którym podawano L-NAME (model przewlekłego hamowania syntazy NO). W modelu db/db stwierdzono podwyższoną aktywację płytek we krwi krążącej w porównaniu z heterozygotami db/+, na co wskazuje podwyższona ekspresja CD62P i CD40L oraz spadek ekspresji CD42b. Ekspresja cyklooksygenazy 1 (COX-1) była podwyższona, fosforylacja białka VASP natomiast znacząco obniżona w płytkach zwierząt o genotypie db/db. Zaobserwowano również nadreaktywność płytek u myszy db/db *in vitro* po stymulacji kolagenem (wyższa ekspresja CD62P i CD40L; obniżona ekspresja CD42b), ADP (niższy poziom CD42b) i trombiną (podwyższone: CD62P, JON/A, wiązanie vWF i fibrynogenu). Stwierdzono, że stężenie jedynie sCD40L ale nie sCD62P było podwyższone w modelu db/db; podobne wyniki uzyskano dla TXB₂ (3,5 wyższe stężenie w grupie db/db w porównaniu do heterozygot db/+). Zupełnie inny profil zmian zarejestrowano u myszy, którym podawano L-NAME – nie wykazano żadnych różnic w ekspresji powierzchniowych markerów aktywacji płytek pomiędzy grupą L-NAME i kontrolą. Podobnie, poziom TXB₂ nie różnił się pomiędzy grupami, natomiast myszy suplementowane L-NAME miały znacząco wyższe stężenia sCD62P i sCD40L w osoczu niż zwierzęta z grupy kontrolnej. W podsumowaniu można stwierdzić, że oba badane modele zwierzęce różnią się zasadniczo jeśli chodzi o profil aktywacji i reaktywności płytek, przy czym te różnice można wykryć i wyjaśnić poprzez monitorowanie szerokiego panelu dostępnych metod badania funkcji płytek, takich jak badania aktywacji, reaktywności i rozpuszczalnych markerów aktywacji w osoczu. Z pracy tej można też wysnuć wniosek natury bardziej ogólnej, że kompleksowa, wieloparametrowa analiza funkcji płytek ma istotne zalety i znacząco zmniejsza ryzyko artefaktów pomiarowych. W świetle wyników przedstawionych w tym artykule, wskazana jest zachowanie daleko idącej ostrożności przy ekstrapolacji wyników badań pochodzących z badań na teoretycznie odpowiednio dobranych modelach zwierzęcych na analogiczne stany chorobowe u ludzi.

Jak już wspomniano wcześniej, nadmierna reaktywność płytek krwi przyczynia się do wzrostu ryzyka zakrzepicy tętniczej, odpowiadającej w dużym stopniu za występowanie takich chorób cywilizacyjnych jak choroby sercowo-naczyniowe (układu krążenia) oraz niedokrwienny udar mózgu. W badaniach opisanych w publikacji oryginalnej [3], metodą cytometrii przepływowej badano ekspresję

selektyny P, ekspresję aktywnej formy receptora GPIIb/IIIa, frakcję mikrocząstek płytkowych (*platelet microparticles* - PMPs) oraz frakcję agregatów płytkowych w płytkach spoczynkowych, a także w płytkach aktywowanych *in vitro* za pomocą panelu agonistów: ADP, TRAP, trombiny. Praca miała na celu ocenę aktywacji i reaktywności płytek u pacjentów po przebytych udarach mózgu oraz odpowiednio dobranej grupie kontrolnej. Badani w obu grupach przyjmowali kwas acetylosalicylowy w dawce 150 mg/dobę. Stwierdzono, że ekspresja selektyny P w płytkach niestymulowanych była znacząco niższa u pacjentów po przebytych udarach. U pacjentów tych zaobserwowano także wyższy odsetek PMPs i obniżony odsetek agregatów w porównaniu z grupą kontrolną. Po stymulacji płytek ADP i trombiną *in vitro* u pacjentów z udarem wykazano mniejszy przyrost ekspresji selektyny P i aktywnej formy GPIIb-IIIa, podczas gdy odsetek PMPs pozostawał istotnie podwyższony. Generalnie, wyniki tej pracy stanowią argument na korzyść teorii zakładającej bardzo dużą heterogenność parametrów aktywacji i reaktywności płytek w grupie pacjentów po udarach mózgu. Wyniki te sugerują także, że aczkolwiek podwyższona aktywacja płytek cechuje pacjentów po udarach mózgu, to zjawisko nasilonego tworzenia się mikrocząstek pochodzenia płytkowego dominuje w profilu aktywacji, przy mniej zaznaczonym udziale degranulacji i agregacji płytek. Taki profil zmian funkcji płytek wydaje się być szczególnie niepożądany z klinicznego punktu widzenia, z uwagi na prokoagulacyjne i proaterogenne właściwości PMPs, którym to cechom towarzyszy dodatkowo obniżona wrażliwość na stosowane leki przeciwplatekcyjne

Zagadnienie dotyczące roli PMPs w niedokrwiennym udarze mózgu było także przedmiotem badań, których wyniki opublikowano w pracy oryginalnej [4]. Wiadomo, że PMPs *in vivo* tworzą się w warunkach wysokich sił ścinających i mogą one odgrywać istotną rolę w procesie miażdżycy. W literaturze naukowej opisywano nadreaktywność płytek w stanach niedokrwiennych mózgu, jednakże związek pomiędzy hiperreaktywnością płytek a miażdżycą ściany tętnicy szyjnej był badany jedynie w kilku pracach klinicznych, których wyniki nie były jednoznaczne. W publikacji oryginalnej [4], badano potencjalny związek pomiędzy stopniem rozwoju miażdżycy ściany naczynia wyrażonej jako zwiększona grubość ściany tętnicy a parametrami aktywacji płytek. Metodą cytometrii przepływowej oznaczano ekspresję powierzchniowych markerów aktywacji płytek (selektyna P, aktywna forma GPIIb-IIIa) i odsetek PMPs przed i po aktywacji płytek agonistami TRAP lub ADP u pacjentów

po przebytych udarach mózgu oraz w grupie kontrolnej. Za pomocą metody ultrasonografii Dopplerowskiej kodowanej kolorem mierzono średnią grubość ściany naczynia (CCA_{sr} IMT), maksymalną wartość IMT (CCA_{max} IMT) i maksymalne rozgałęzienie IMT (BIF_{max} IMT). U pacjentów z udarem, parametry grubości ściany naczynia były podwyższone w porównaniu z grupą kontrolną, podobnie jak odsetek PMPs przed i po stymulacji płytek agonistami *ex vivo*. Metodą regresji wykazano dodatnią i istotną korelację pomiędzy odsetkiem PMPs a parametrem CCA_{sr} IMT oraz wystąpieniem udaru, podczas gdy wiązanie PAC-1 do płytek aktywowanych ADP było skorelowane ujemnie z CCA_{sr} IMT i obecnością blaszki miażdżycowej. W podsumowaniu, w pracy wykazano dodatnią asocjację pomiędzy tworzeniem się PMPs i IMT u pacjentów po przebytych udarach. Zależność taka może mieć znaczenie w rozwoju procesu miażdżycy w tętnicy szyjnej. Ponadto, praca dostarcza nowych informacji w kontekście reaktywności płytek w udarach mózgu szczególnie w odniesieniu do słabego agonisty płytkowego, jakim jest ADP.

Podsumowanie osiągnięcia naukowego:

- Przedstawienie szczegółowego i szerokiego przeglądu piśmiennictwa naukowego na temat: roli czynników genetycznych w kształtowaniu zmienności osobniczej płytek dotyczącej ich odpowiedzi na działanie agonistów i antagonistów [1]; biologii i farmakologii receptorów dla ADP [2], funkcji płytek w cukrzycy i otyłości [5].
- Weryfikacja eksperymentalna i ocena protokołu do monitorowania skuteczności leczenia przeciwplatekowego aspiryną; przedstawienie dowodów, że wariant generacji TXA_2 w surowicy jest najlepszym dostępnym protokołem laboratoryjnym do wykrywania efektywności działania aspiryny, opartym na testach biochemicznych [6].
- Poszerzenie istniejącego stanu wiedzy dotyczącego mysiego modelu cukrzycy db/db u myszy, szczególnie w kontekście funkcji płytek krwi w tym modelu [7]; należy zaznaczyć, że w literaturze istnieją jedynie pojedyncze prace na ten temat.
- Uzyskanie nowych wyników przyczyniających się do lepszego poznania roli płytek krwi, a w szczególności mikrocząstek pochodzenia płytkowego, w patogenezie niedokrwiennej udaru mózgu [3, 4].

OMÓWIENIE POZOSTAŁYCH OSIĄGNIĘĆ NAUKOWO-BADAWCZYCH**A) Autorstwo publikacji naukowych**

Autor **39 publikacji oryginalnych** w recenzowanych czasopismach naukowych (IF=55,439; MNiSW=474), w tym:

- 26 publikacji z bazy JCR (łącznie IF=55,439, łączna punktacja MNiSW=421)
- 13 publikacji spoza bazy JCR (łączna punktacja MNiSW=53)

Autor **5 publikacji przeglądowych** w recenzowanych czasopismach naukowych (łącznie IF=2,892, łączna punktacja MNiSW=28) w tym:

- 2 publikacje z bazy JCR (łącznie IF=2,892, łączna punktacja MNiSW=20),
- 3 publikacje spoza bazy JCR (łączna punktacja MNiSW=8)

Autor **jednej publikacji kazuistycznej** (MNiSW=8)

Autor **jednego rozdziału w książce** (MNiSW=7)

Redaktor jednej książki (wraz z prof. dr hab. Cezarym Watałą); autor 7 rozdziałów w tej książce.

Łączna liczba cytowań 416 [390 bez autocytowań] (wg Web of Science), 505 (wg Scopus), indeks Hirscha=10 (wg Web of Science), indeks Hirscha=11 (wg Scopus).

B) Udział w zjazdach naukowych

Autor 73 komunikatów zjazdowych, w tym:

- 41 na zjazdach międzynarodowych
- 32 na zjazdach krajowych

C) Autorstwo zgłoszeń patentowych

Autor 2 zgłoszeń patentowych, w tym:

- 1 zgłoszenie patentowe międzynarodowe (PCT)
- 1 zgłoszenie patentowe krajowe (Urząd Patentowy RP)

D) Udział w projektach badawczych

- Kierownik dwóch zakończonych i rozliczonych projektów własnych MNiSW
- Główny wykonawca zakończonego i rozliczonego projektu promotorskiego KBN na finansowanie własnej pracy doktorskiej
- Zastępca kierownika zakończonego i rozliczonego wysokobudżetowego projektu finansowanego w ramach 1.3.1 PO IG; kierownik zadania badawczego w tym projekcie
- Wykonawca dwóch zakończonych i rozliczonych grantów NATO
- Wykonawca 4 zakończonych i rozliczonych projektów KBN/MNiSW
- Kierownik dwóch zakończonych i rozliczonych tematów prac własnych Uniwersytetu Medycznego w Łodzi (jeden zakończony w 2006 roku, drugi zakończony w 2009).
- Wykonawca obecnie realizowanego projektu NCN MAESTRO
- Wykonawca obecnie realizowanego wysokobudżetowego projektu 1.1.2 POIG
- Wykonawca obecnie realizowanego projektu STRATEGMED

Szczegółowe dane dotyczące projektów badawczych przedstawiono w Tabeli 1.

Tab. 1. Udział habilitanta w realizacji projektów badawczych.

Tytuł i numer projektu	Typ	Rola	Status
ZAKOŃCZONE			
Wpływ laktonów seskwiterpenowych i pochodnych flawonowych pochodzenia roślinnego na płytki krwi i śródbłonek naczyńowy N N405 611238	własny MNiSW	Kierownik	Zakończony w 2013
Wpływ polimorfizmów genu purynoreceptora P2Y ₁₂ na wrażliwość płytek krwi na inhibitory P2Y ₁₂ Nr 2 P05A 058 27	własny MNiSW	Kierownik	Zakończony w 2007
Znaczenie polimorfizmu PIA1/A2 glikoproteiny GPIIb w odpowiedzi płytek na działanie czynników aktywujących oraz antagonistów receptora dla fibrynogenu oraz w kształtowaniu reaktywności płytek w wybranych stanach klinicznych 4P05A 04016	promotorski KBN	Główny wykonawca (doktorant)	Zakończony w 2000
Przygotowanie preparatów polifenolowych pochodzenia roślinnego o właściwościach przeciwplatek i kardioprotekcyjnych - FLAWOPIRYNA, działanie 1.3.1 PO IG, UDA-POIG.01.03.01-10-129/08-04	Fundusze strukturalne UE	Zastępca kierownika projektu, kierownik zadania badawczego	Zakończony w 2013
Novel agents for limiting endothelial injury in diabetes mellitus active compounds CLG.981884	NATO	Wykonawca	Zakończony w 2007
Molecular mechanisms of differentiated platelet response to pharmacologically active compounds. CLG.980106	NATO	Wykonawca	Zakończony w 2005
Molekularne mechanizmy osłabionej wrażliwości lub oporności na aspirynę w wybranych stanach klinicznych 4P05B10222	Własny KBN	Wykonawca	Zakończony w 2004
Poszukiwanie możliwych uwarunkowań molekularnych zmienionej reaktywności i funkcji płytek krwi u pacjentów z cukrzycą typu 2, KBN 4P05B 056 14	Własny KBN	Wykonawca	Zakończony w 2000
Etiopatogeneza chorób autoagresyjnych: uwarunkowanie genetyczne zaburzeń procesu aktywacji limfocytów T przez komórki prezentujące antygen w cukrzycy insulinozależnej i celiakii, 4P05E 085 13	Własny KBN	Wykonawca	Zakończony w 1998
Cukrzyca insulinozależna (typ 1): poszukiwanie zależności pomiędzy polimorfizmem subregionu DQ a wartością funkcji dyskryminacyjnej wybranych parametrów biochemicznych i fizjologicznych, 4P05E 053 08	Własny KBN	Wykonawca	Zakończony w 1996
REALIZOWANE			
Tytuł i numer projektu	Typ projektu	Rola	Status/Okres realizacji
Śródbłonek naczyńowy w chorobach cywilizacyjnych: od badań poznawczych do oferty innowacyjnego leku o działaniu śródbłonkowym, POIG.01.01.02-00-069/09	1.1.2 PO IG	Wykonawca	Realizowany 2010-2015
Czy potranslacyjne nieenzymatyczne modyfikacje białek płytkowych wpływają na adhezję płytek do śródbłonka w	MAESTRO NCN	Wykonawca	Realizowany 2013-2018

warunkach znaczącej hiperglikemii? Cukrzyca jako podłoże miażdżycy wynikającej z glikacji i glikooksydacji białek, 2012/06/A/NZ5/00069

Farmakoterapia śródbłonna naczyniowego i aktywacji płytek krwi zależna od prostacykliny, tlenu azotu i tlenu węgla – nowa strategia w zapobieganiu przerzutowości nowotworowej

StrategMed
NCBR

Wykonawca

Realizowany
2015-2018

E) Nagrody naukowe

- Nagroda Indywidualna Prezesa Rady Ministrów za wyróżnioną pracę doktorską, Warszawa, 2002 rok.
- Nagroda Zespołowa Ministra Zdrowia za cykl publikacji „Molekularne aspekty reaktywności płytek krwi”, Warszawa, 2003 rok.
- Nagroda Zespołowa Ministra Zdrowia za cykl publikacji „Molekularne mechanizmy działania leków przeciwplatek”, Warszawa, 2006 rok.
- Nagrody zespołowe Rektora Uniwersytetu Medycznego w Łodzi (3): I° (2010, 2012), III° (2014)

F) Przebieg kariery naukowej i zainteresowania badawcze

W latach 1995-1998 pracowałem jako młodszy asystent (etat Państwowego Szpitala Klinicznego nr 4 w Łodzi) w Pracowni Biologii Molekularnej, II Kliniki Chorób Dzieci Instytutu Pediatrii Akademii Medycznej w Łodzi (Kierownik pracowni dr H. Witas, Kierownik Kliniki prof. dr hab. J. Bodalski). W tym okresie zajmowałem się badaniem genetycznych uwarunkowań cukrzycy typu I oraz celiakii, obszarem mojego zainteresowania były również zaburzenia funkcji płytek krwi w cukrzycy. Podczas pracy w Instytucie Pediatrii zdobyłem pierwsze doświadczenia jako wykonawca 2 grantów KBN „*Cukrzyca insulinozależna (typ 1): poszukiwanie zależności pomiędzy polimorfizmem subregionu DQ a wartością funkcji dyskryminacyjnej wybranych parametrów biochemicznych i fizjologicznych*” oraz „*Etiopatogeneza chorób autoagresyjnych: uwarunkowanie genetyczne zaburzeń procesu aktywacji limfocytów T przez komórki prezentujące antygen w cukrzycy insulinozależnej i celiakii*”. Na tym wczesnym etapie swojej kariery naukowej doskonaliłem swój warsztat badawczy (metody genotypowania mutacji i polimorfizmów w oparciu o technikę PCR, różne typy elektroforezy i blottingu) oraz zdobywałem doświadczenia w sposobach gromadzenia, analizy i prezentacji wyników w formie prezentacji ustnych i plakatowych oraz przygotowania publikacji naukowych. Moja praca badawcza w tym ośrodku zaowocowała współautorstwem w 9 publikacjach oryginalnych, jednej przeglądowej oraz 18 komunikatach na zjazdach naukowych.

W roku 1998 rozpocząłem pracę jako młodszy asystent (etat Państwowego Szpitala Klinicznego nr 1 w Łodzi) w ówczesnej Samodzielnej Pracowni Zaburzeń Krzepnięcia Krwi Katedry Diagnostyki Laboratoryjnej Akademii Medycznej w Łodzi (Kierownik Pracowni dr hab. Cezary Watała). W latach 1998-2001 realizowałem projekt promotorski uwieńczony w roku 2001 - obroną pracy doktorskiej pt. „*Znaczenie polimorfizmu P1A1/A2 glikoproteiny GPIIIa w odpowiedzi płytek na działanie czynników aktywujących oraz antagonistów receptora dla fibrynogenu oraz w kształtowaniu reaktywności płytek w wybranych stanach klinicznych*”. Praca doktorska została uznana za wyróżniającą i w roku 2002 uzyskałem za nią Nagrodę Prezesa Rady Ministrów. W tym okresie moje zainteresowania naukowe koncentrowały się w sposób naturalny głównie na tematyce mojej pracy doktorskiej.

Poza tym, interesowałem się także innymi polimorfizmami genetycznymi i mutacjami genów kodujących białka biorące udział w procesie hemostazy. Część swojej aktywności zobowiązany byłem również poświęcić na realizację grantu „Poszukiwanie możliwych uwarunkowań molekularnych zmienionej reaktywności i funkcji płytek krwi u pacjentów z cukrzycą typu 2, KBN 4P05B 056 14”. Ten okres mojej działalności naukowej (przed doktoratem) zaowocował 8 publikacjami oryginalnymi i 2 przeglądowymi.

W latach 2002-2004 pracowałem w Zakładzie Zaburzeń Krzepnięcia Krwi Katedry Diagnostyki Laboratoryjnej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi na stanowisku asystenta, a od roku 2004 do chwili obecnej pracuję w tej samej jednostce na stanowisku adiunkta. W tym okresie zainteresowania naukowo-badawcze koncentrowały się i dalej dotyczą następujących zagadnień:

- molekularne mechanizmy zróżnicowanej wrażliwości/oporności płytek krwi na kwas acetylosalicylowy
- polimorfizmy glikoprotein płytkowych oraz ich znaczenie w kształtowaniu zróżnicowanej osobniczo odpowiedzi płytek na działanie czynników aktywujących
- polimorfizmy genetyczne związane z dziedziczną trombofilią w wybranych stanach klinicznych
- nieenzymatyczne modyfikacje białek w cukrzycy
- wpływ polifenoli roślinnych oraz innych związków pochodzenia naturalnego na funkcję płytek krwi
- zasady prowadzenia badań naukowych i metodologia w naukach biomedycznych
- ochrona własności intelektualnej i komercjalizacja badań naukowych w naukach biomedycznych

OMÓWIENIE DZIAŁALNOŚCI I OSIĄGNIĘĆ DYDAKTYCZNYCH I ORGANIZACYJNYCH

A) Omówienie działalności i osiągnięć dydaktycznych

Od momentu rozpoczęcia pracy jako nauczyciel akademicki, tj. od roku 2002 do chwili obecnej, jestem zaangażowany w prowadzenie zajęć dydaktycznych. Wraz z prof. dr hab. Cezarym Watałą byłem pomysłodawcą i uczestniczyłem w opracowaniu programu nauczania przedmiotu: "Metodologia badań naukowych i ochrona własności intelektualnej" dla studentów studiów I i II stopnia kierunków: Zdrowie Publiczne, Ratownictwo Medyczne, Techniki Dentystyczne oraz z przedmiotu „Zasady prowadzenia badań naukowych i przygotowywania publikacji naukowych” dla słuchaczy stacjonarnego i niestacjonarnego studium doktoranckiego. Od lat prowadzę wykłady, seminaria i ćwiczenia dla wyżej wymienionych kierunków. Byłem również pomysłodawcą i jestem współredaktorem podręcznika będącego pomocą dydaktyczną do nauczania metodologii badań naukowych (Watała C, Różalski M (red.) Badania i publikacje w naukach biomedycznych Tom 1 i 2, Watała C, Różalski M, Boncler M, Kaźmierczak P, Alfa Medica Press 2011, Bielsko Biała. Jestem autorem i współautorem 7 rozdziałów w tymże podręczniku.).

W latach 2006-2009 prowadziłem ćwiczenia dotyczące wybranych zagadnień hemostazy dla studentów anglojęzycznych Wydziału Lekarskiego w ramach przedmiotu „Clinical Physiology”.

B) Omówienie działalności i osiągnięć organizacyjnych

Byłem członkiem komitetu organizacyjnego krajowych warsztatów naukowych INTER-HEMOSTAZA, które odbywały się w corocznie w latach 1998-2004.

W roku 2008 byłem odpowiedzialny za koordynację przygotowania wniosku oraz studium wykonalności wysokobudżetowego projektu „Przygotowanie preparatów polifenolowych pochodzenia roślinnego o właściwościach przeciwplatekcyjnych i kardioprotekcyjnych - FLAWOPIRYNA” (kwota dofinansowania 7,13 mln PLN), składanego przez konsorcjum Uniwersytetu Medycznego w Łodzi (lider konsorcjum) oraz partnerów (Politechnika Łódzka i Uniwersytet Łódzki). Projekt ten uzyskał dofinansowanie i był realizowany w latach 2009-2013. W projekcie FLAWOPIRYNA

pełniłem funkcję zastępcy kierownika projektu oraz kierownika jednego z 7 zadań badawczych.

Od roku 2013 pełnię funkcję członka Uczelnianej Komisji ds. Ochrony Własności Intelektualnej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, biorąc udział w recenzowaniu wniosków składanych przez pracowników Uczelni, którzy ubiegają się o finansowanie zgłoszeń patentowych z środków uczelnianych.

