



Prof. dr hab. n. farm. Ewa Chabielska
Samodzielna Pracownia Biofarmacji
Uniwersytet Medyczny w Białymstoku
ul. Mickiewicza 2C
15-222 Białystok
e-mail: chabewa@poczta.onet.pl

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

pt., „Metabolizm tlenowy jako kluczowy modulator aktywacji płytek krwi – zmiany w metabolizmie energetycznym oraz w aktywności płytkowej cyklooksygenazy 1 w warunkach podwyższonego stężenia glukozy w środowisku - badania *in vitro* oraz *in vivo*”
wykonanej przez mgr Karolinę Siewierę w Zakładzie Zaburzeń Krzepnięcia Krwi Katedry Nauk Biomedycznych Uniwersytetu Medycznego w Łodzi.

Dane Międzynarodowej Federacji Diabetologicznej od lat donoszą o dynamicznym wzroście zachorowalności na cukrzycę. Rozwijające się w przebiegu tej choroby powikłania naczyniowe o etiologii zakrzepowej znajdują się w czołówce listy przyczyn niepełnosprawności i śmiertelności pacjentów. Poznanie molekularnych mechanizmów prowadzących do zwiększonej aktywacji i reaktywności płytek krwi w zakrzepowych powikłaniach cukrzycy znajduje się obecnie wśród palących zadań stojących przed badaczami nauk podstawowych. Wobec powyższego wybór tematu rozprawy doktorskiej uważam za bardzo trafny i ważny, także z perspektywy klinicznej.

Praca doktorska mgr Karoliny Siewiery została wykonana pod kierunkiem Pana Prof. dr hab. n. med. Cezarego Watały, kierującego zespołem wiodącym w badaniach nad fizjologią i patologią płytek krwi. Doktorantka wytyczyła dwa główne cele swojej pracy badawczej. Pierwszym była ocena udziału cyklooksygenazy 1 (COX-1) w produkcji czynnika aktywującego płytki krwi - tromboksanu A₂ i zmian w ekspresji i aktywności tego enzymu w warunkach przewlekłej hiperglikemii. Kolejnym celem było określenie wpływu zmian w oddychaniu mitochondrialnym oraz potencjału mitochondrialnego w płytkach krwi w stanie przewlekłej hiperglikemii i korelacji tych zmian z parametrami aktywacji płytek krwi.

W wieloetapowych badaniach Doktorantka wykorzystwała szeroki i nowoczesny warsztat badawczy, co stanowi również o dużej wartości rozprawy. Doktorantka użyła modele cukrzycy typu I i II u zwierząt laboratoryjnych (szczury z cukrzycą STZ – model

chemicznie indukowany i myszy db/db – model genetyczny) oraz model hiperglikemii *in vitro*, w których wykonała szereg badań wykorzystując między innymi metodykę cytometrii przepływowej, HPLC-MS/MS, techniki biologii molekularnej, oznaczenia biochemiczne, immunoenzymatyczne, elektrochemiczne czy polarograficzne.

Do najważniejszych wyników, które Doktorantka uzyskała zaliczam:

1. Wykazanie, że w warunkach przewlekłej hiperglikemii, płytki krwi badanych zwierząt wykazują większą ekspresję i aktywność białka COX-1, co ma związek ze zwiększoną produkcją prostaglandyny H₂ i tromboksanu A₂. Interesująca jest także obserwacja, wskazująca, iż wzrost aktywności COX-1 w warunkach przewlekłej hiperglikemii może być związany z mechanizmem innym, niż proces glikacji tego enzymu.
2. Dowiedzenie zależności pomiędzy funkcjonowaniem mitochondriów płytek krwi w cukrzycy a ich aktywacją w oparciu o wyniki wskazujące na wzrost oddychania mitochondrialnego i potencjału mitochondrialnego płytek korelujące z ekspresją markerów aktywacji płytek krwi.
3. Wykazanie, że długotrwała (5 miesięczna) hiperglikemia (myszy db/db, szczury z cukrzycą STZ) zwiększa stopień aktywacji płytek i ich reaktywność.

W mojej opinii powyższe odkrycia, poza zrozumieniem zależnych od metabolizmu tlenowego mechanizmów regulacji funkcji płytek krwi w cukrzycy, mogą wytyczać potencjalne szlaki hamowania ich prokoagulacyjnych funkcji. Wysoko oceniam przeprowadzone badania i pragnę podkreślić ich nowatorskie elementy. Praca stanowi bowiem jedno z pierwszych doniesień prezentujących funkcjonowanie mitochondriów w płytkach krwi w przewlekłej cukrzycy i wskazuje również na zależność pomiędzy funkcjonowaniem mitochondriów a aktywacją trombocytów, a także charakteryzuje zmiany funkcji COX-1, wskazując na mechanizmy tych zmian. Uzyskane wyniki mają również znaczenie metodologiczne, gdyż są pierwszym opracowaniem, w którym kompleksowo oceniono zmiany funkcji płytek krwi jako efekt długotrwałego procesu patologicznego stymulowanego hiperglikemią. Przedstawione w rozprawie wyniki Doktorantka zawarła w 4 oryginalnych pracach opublikowanych w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym o sumarycznym współczynniku oddziaływania (IF) wynoszącym 11,747.

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska mgr Karoliny Siewiery została napisana w postaci klasycznego opracowania, do którego Autorka włączyła także rozdział, w

którym przedstawia swoje osiągnięcia naukowe. Ich analiza dowodzi, że Doktorantka prezentuje bardzo wysoki poziom naukowy, wyrażony dużym dorobkiem publikacyjnym (18 prac, 2 rozdziały w książkach), licznymi doniesieniami na zjazdach o zasięgu międzynarodowym i pozyskaniem własnych grantów naukowych.

Wstęp rozprawy zawiera informacje o wpływie hiperglikemii na procesy hemostazy ze szczególnym uwzględnieniem zmian w funkcjonowaniu płytek krwi i tlenozależnych mechanizmów regulacji aktywacji płytek. Szczególnie zajmująca, z racji na skromne jeszcze dane w piśmiennictwie światowym, jest część poświęcona roli mitochondriów w procesach aktywacji płytek krwi, także w powiązaniu ze stanem hiperglikemii. Doktorantka wzbogaciła omawiane we wstępie zagadnienia rycinami. Nie umieściła przy nich jednak, co powinno być standardem, odnośnika literaturowego ani nie zaznaczyła, czy są to ryciny autorskie.

W części metodycznej rozprawy Doktorantka bardzo starannie i szczegółowo opisała stworzony model badawczy, który w mojej opinii może być dalej rozwijany i wykorzystywany w ocenie funkcji płytek krwi w warunkach hiperglikemii. W opisie dotyczącym indukcji 5-miesięcznej cukrzycy indukowanej streptozotocyną powinien być umieszczony odnośnik literaturowy oraz informacje o śmiertelności zwierząt.

Wyniki badań przedstawione są prawidłowo na 17 rycinach i w 6 tabelach, a przeprowadzona analiza statystyczna jest adekwatna do rodzaju analizowanych zmiennych. Bardzo wartościowa jest też interpretacja wyników w trakcie ich opisu, wyjaśniająca tok postępowania eksperymentatora.

Dyskusja jest podzielona na tematyczne podrozdziały, co sprawia, że rozdział ten jest bardzo klarowny. Doktorantka w sposób dojrzały omawia rezultaty badań dobrze wpisując je w kontekst własnych hipotez badawczych i dotychczas opublikowanych prac. Pragnę zwrócić szczególną uwagę na krytyczną analizę wyników oraz zwrócenie uwagi na ograniczenia metodologiczne np.: konfrontację wyników *in vitro* i obserwacji *ex vivo*. Dowodzi to wiedzy merytorycznej Doktorantki i umiejętności spojrzenia na pracę badawczą z należąca rozwagą. Zgodnie z moją wiedzą brak jest doniesień opisujących kompleksowo zmiany aktywacji i reaktywności płytek krwi w pięciomiesięcznej cukrzycy u zwierząt laboratoryjnych. Szkoda zatem, że ten nowatorski aspekt rozprawy nie został w dyskusji należycie wyeksponowany. W opinii Recenzenta wybór takiego modelu cukrzycy jest bardzo wartościowy. Czasowy czynnik jest kluczowy w toku rozwoju zmian narządowych i układowych w hiperglikemii. To niewątpliwie wytycza kierunki dalszych badań, a więc związków między wzrostem stresu

oksydacyjnego w wyniku długotrwałej hiperglikemii, do czego Doktorantka wielokrotnie nawiązuje omawiając badania, a zmianami funkcji płytek krwi w aspekcie odkrytych mechanizmów. Taki model ma też wartość metodologiczną w odniesieniu do sytuacji klinicznej, oferuje bowiem możliwość włączenia terapii przeciwcukrzycowej i przeciwplatekowej.

Końcowe wnioski i podsumowanie wyników badań usystematyzowano w 11 trafnie sformułowanych punktach. Rozprawę doktorską, liczącą 155 stron, zamyka spis piśmiennictwa składający się z 235 trafnie dobranych pozycji.

Podsumowując, bardzo wysoko oceniam rozprawę doktorską mgr Karoliny Siewiery pod tytułem: „*Metabolizm tlenowy jako kluczowy modulator aktywacji płytek krwi – zmiany w metabolizmie energetycznym oraz w aktywności płytkowej cyklooksygenazy 1 w warunkach podwyższonego stężenia glukozy w środowisku - badania in vitro oraz in vivo*”, podkreślając jej nowatorstwo, sposób rozwiązania problemu badawczego oraz interpretację wyników.

Rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 z późn. zm.).

Wnoszę zatem do Wysokiej Rady Wydziału Nauk o Zdrowiu Uniwersytetu Medycznego w Łodzi o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie mgr Karoliny Siewiery do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Do mojej recenzji dołączam wniosek o wyróżnienie rozprawy doktorskiej.



Białystok, 04 kwietnia 2018r.