

## Recenzja rozprawy doktorskiej

**pt., „Formowanie mikrocząstek pochodzenia płytkowego a wysoka resztkowa reaktywność płytek krwi i zaawansowanie miażdżycy tętnic szyjnych u chorych po niedokrwiennym udarze mózgu leczonych kwasem acetylosalicylowym”**

1

wykonanej przez lek. Justynę Rosińską

w Katedrze i Klinice Neurologii Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

pod kierunkiem dr hab. n. med. Marii Łukasik

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska lek. Justyny Rosińskiej dotyczy oceny potencjalnego związku między liczbą krążących mikrocząstek pochodzenia płytkowego (pMVs), ich potencjałem prozapalnym i prozakrzepowym a zaawansowaniem miażdżycy tętnic szyjnych, wysoką reaktywnością płytek krwi mimo leczenia (HTPR), oraz występowaniem kolejnych zdarzeń naczyniowych u chorych po udarze niedokrwiennym mózgu, leczonych za pomocą kwasu acetylosalicylowego (ASA). Wyniki uzyskane w grupie chorych były porównywane do wyników dla dobrze dobranej grupy kontrolnej, którą stanowiły osoby obciążone czynnikami ryzyka chorób sercowo-naczyniowych podobnie jak w przypadku grupy badanej. Uzupełnieniem badań była ocena wpływu przyjmowania ASA na uwalnianie i fenotyp mikrocząstek pochodzenia płytkowego w grupie zdrowych ochotników. We Wnioskach z przeprowadzonego badania Doktorantka podkreśla, że prezentowany projekt jest pierwszym, który ocenia związek pomiędzy stanem ilościowym i jakościowym pMVs a zaawansowaniem miażdżycy tętnic szyjnych, HTPR w trakcie leczenia za pomocą ASA, oraz występowaniem incydentów naczyniowych u chorych po udarze niedokrwiennym mózgu i obciążonych czynnikami ryzyka chorób sercowo-naczyniowych. Warty podkreślenia jest fakt, że w badaniach zastosowano nowoczesną technikę cytometrii przepływowej w oparciu o cytometr dedykowany do oznaczeń nano- i mikroobiektów. Do najważniejszych wyników opisanych w pracy należy: 1) brak różnicy w ilości pMVs pomiędzy grupą pacjentów po udarze mózgu i grupą kontrolną, z wyjątkiem obniżonej ilości pMVs CD62P+ w grupie osób po udarze w porównaniu do grupy kontrolnej po 3 dniach leczenia za pomocą ASA; 2) wyższe stężenie pMVs CD62P+ i pMVs PAC-1+ u pacjentów z miażdżycą tętnic szyjnych po przebyłym udarze niedokrwiennym mózgu; 3) istotnie wyższe stężenia pMVs z ekspresją fosfatydyloseryny (PS), CD62P, aktywnej formy GPIIb/IIIa i CD31 u chorych po udarze mózgu, którzy w czasie rocznej obserwacji doświadczyli ponownego zdarzenia naczyniowego. Wyniki te były niezależne od reaktywności płytek krwi ocenianej w teście agregacji z kwasem arachidonowym. Ponadto nie wykazano różnic w badanych parametrach pMVs między osobami z wysoką reaktywnością płytek krwi mimo leczenia ASA i osobami bez HTPR podczas leczenia ASA. Przystawione w Komentarzu do Rozprawy Doktorskiej najważniejsze wyniki Doktorantka opisała właściwym komentarzem, którego podsumowaniem może być stwierdzenie, że

Bluszcz

formowanie pMVs nie jest procesem powiązaniem z aktywacją płytek krwi (konkretnie z agregacją zależną od kwasu arachidonowego), a w występowaniu kolejnych zdarzeń naczyniowych pomimo leczenia kwasem acetylosalicylowym czy zmian miażdżycowych u chorych po przebyciu udaru niedokrwiennym mózgu odgrywa rolę nie tyle ilość generowanych pMVs co fenotyp mikrocząstek (obecność na powierzchni pMVs CD62P, PS, GPIIb/IIIa, CD31). Ponadto, przyjmowanie ASA, jak również zwiększenie dobowej dawki tego leku z 75 do 150 mg, nie spowodowały zmian w stężeniach badanych pMVs u chorych po udarze mózgu oraz w grupie kontrolnej, co sugeruje ograniczone działanie ASA nie tylko na uwalnianie, ale także na prozakrzepowe i prozapalne funkcje pMVs. Ostateczny wniosek opisany przez Doktorantkę o możliwości potencjalnego wykorzystania oznaczeń pMVs z uwzględnieniem ich fenotypów, jako testów diagnostycznych w monitorowaniu terapii i stratyfikacji ryzyka sercowo-naczyniowego, jest dość powściągliwy i świadczy o dużym samokrytycyzmie i dojrzałości naukowej Doktorantki, która w uzupełnieniu wniosków szczegółowo sformułowała ograniczenia opisywanego projektu w ostatnim rozdziale Komentarza do Rozprawy Doktorskiej.

Rozprawa doktorska lek. Justyny Rosińskiej została napisana w postaci wielostronicowego komentarza do zbioru 4 publikacji opublikowanych w latach 2017 – 2019 w recenzowanych czasopismach o zasięgu międzynarodowym. Doktorantka jest pierwszym autorem i jednocześnie autorem korespondencyjnym we wszystkich publikacjach, w tym w 3 pracach oryginalnych i jednej pracy przeglądowej, co definiuje Jej kluczowy wkład w ich powstanie. Sumaryczna wartość IF prezentowanych prac wynosi 9,143 punktów, sumaryczna punktacja MNiSW wynosi 220 punktów. Praca obejmuje Komentarz do rozprawy doktorskiej stanowiący 25 stron maszynopisu, włączając w to streszczenie w języku polskim i angielskim, literaturę uzupełniającą (34 pozycje bibliografii), oraz załączniki w tym Publikacje wchodzące w skład rozprawy doktorskiej (57 stron), Oświadczenia doktoranta i współautorów o udziale w publikacjach (23 strony) i Zgody komisji bioetycznej Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu (4 uchwały o pozytywnym zaopiniowaniu wniosku na prowadzenie badań naukowych). Zgodnie z przedstawionymi oświadczeniami udział lek. Justyny Rosińskiej w przygotowaniu publikacji był nie mniejszy niż 58% i polegał najczęściej na współudziale w zaprojektowaniu badania, selekcji badanej grupy, zbieraniu materiału biologicznego, oznaczaniu reaktywności płytek krwi, przygotowaniu bazy danych, opracowaniu wyników, analizie statystycznej wyników, gromadzeniu i analizie piśmiennictwa, przygotowaniu manuskryptu, odniesieniu się do uwag recenzentów i pozyskaniu finansowania projektu z funduszy Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu. Warto jeszcze dodać, że publikacje włączone do rozprawy doktorskiej lek. Justyny Rosińskiej opublikowane zostały w wiodących czasopismach z zakresu tematyki płytek krwi i chorób sercowo-naczyniowych.

Publikacja przeglądowa pt. „*The Impact of Vascular Disease Treatment on Platelet-Derived Microvesicles*” jest bardzo dobrym wprowadzeniem w temat mikrocząstek pochodzenia płytkowego, ich charakterystyki, właściwościom, uwalnianiu czy metodologii do oznaczania tych małych obiektów. W pracy uwaga skoncentrowana jest na wpływie leczenia przeciwplatekowego z zastosowaniem nieodwracalnych inhibitorów cyklooksygenazy (w tym ASA), inhibitorów receptora P2Y<sub>12</sub> dla ADP, inhibitorów fosfodiesteraz czy antagonistów GPIIb/IIIa na ilościową i jakościową ocenę mikrocząstek. Ponadto, w publikacji opisane jest modulowanie mikrocząstek przez stosowanie leków

hipolipemizujących, hipoglikemicznych, hipotensyjnych czy antykoagulantów oraz rolę składników diety takich jak kwasy wielonienasycone, polifenole. Podsumowanie przedstawione w Tabeli 2 w publikacji wskazuje, że w większości badań stosowanie ASA w dawce 75-320 mg/ dzień nie wpływa na stężenie mikrocząstek czy to u zdrowych ochotników, czy u chorych z nadciśnieniem tętniczym, chorobami sercowo-naczyniowymi, cukrzycą czy po udarze mózgu. Natomiast pozostałe leki w większości przytoczonych badań, a szczególnie inhibitory receptora dla ADP czy statyny, obniżają stężenie pMVs. W świetle stwierdzenia, że mikrocząstki pochodzenia płytkowego produkowane są głównie w wyniku aktywacji płytek krwi, której efektem jest uwalnianie mikrocząstek z błony komórkowej, trudno wyjaśnić nieskuteczność ASA, powszechnie stosowanego leku przeciwplatekowego, w obniżaniu stężenia pMVs. Pomimo, że z roku na rok coraz więcej badań z zakresu mikrocząstek publikowanych jest w literaturze naukowej, to na dzień dzisiejszy nie można jednoznacznie powiedzieć, że generacja pMV jest powiązana jedynie z aktywacją płytek krwi. Wiadomo jednak, że ilość, morfologia czy skład molekularny pMVs zależy od rodzaju sygnału komórkowego i jest modyfikowana przez takie czynniki jak wiek płytek krwi (młode vs. stare), stan naczyń krwionośnych (siły ścinające, nienaruszony śródbłonek naczyniowy, obecność i lokalizacja skrzepu) czy warunki poprzedzające przekazanie sygnału w płytkach (wysokie stężenie glukozy, obecność LPS czy modyfikowanych lipoprotein).

3

Mikrocząstki pochodzenia płytkowego stanowią heterogenną populację małych obiektów otoczonych błoną komórkową. Ze względu na ich rolę są uważane za potencjalne markery prognostyczne wielu chorób, i zainteresowanie nimi w znaczeniu klinicznym wzrasta w szybkim tempie. Podwyższone stężenie pMVs i pozytywną korelację stężenia pMVs z aktywnością choroby wykazano w chorobach zakrzepowych, cukrzycy, chorobach autoimmunologicznych. Nie mniej jednak obecnie nie można jednoznacznie powiedzieć w jakim stopniu stężenie czy skład pMVs odpowiada aktywacji płytek krwi w wymienionych chorobach. Wydaje się, że dopiero wyjaśnienie tego powiązania w przyszłości pozwoli potwierdzić oznaczenie pMVs jako atrakcyjnych biomarkerów w badaniach klinicznych. Badania opisane w publikacjach oryginalnych zawartych w rozprawie doktorskiej lek. Justyny Rosińskiej są zgodne ze wspomnianym nurtem badawczym. W publikacjach opisano próbę powiązania ilości i jakościowego składu pMVs z uwzględnieniem antygenów powierzchniowych i obecności fosfatydyloseryny z udarem niedokrwiennym mózgu, obecnością zmian miażdżycowych w tętnicy szyjnej, wystąpieniem incydentów naczyniowych, oraz reaktywnością płytek krwi w czasie leczenia kwasem acetylosalicylowym. W badaniach nie wykazano zwiększonych stężeń pMVs CD61+, a różnice dotyczyły fenotypu mikrocząstek, szczególnie obecności pMVs CD62P+/CD61+. Warto też zauważyć, że podwyższone stężenia pMV o określonym fenotypie obserwowane w przypadku zaawansowanych zmian miażdżycowych czy wystąpienia incydentu naczyniowego dotyczyły grupy pacjentów po przebytych udarach mózgu pomimo stosowania ASA. Natomiast w grupie kontrolnej nie wykazano różnicy w ilości i jakości pMVs pomiędzy podgrupami różniącymi się pod względem zaawansowania miażdżycy czy występowania incydentów naczyniowych. Nie było także różnic pMVs pomiędzy grupami, w których obserwowano a tymi grupami w których nie obserwowano wysokiej reaktywności płytek krwi pomimo stosowania ASA niezależnie czy dotyczyło to grupy pacjentów z udarem czy grupy kontrolnej. Wyniki opisane w pracach są bardzo interesujące i wskazują na

Bdusz

konieczność kontynuowania badań. Interesującą obserwacją jest również obniżone stężenie pMVs CD61+/CD62P+ w grupie pacjentów z udarem mózgu w porównaniu do odpowiednio dobranej grupy kontrolnej oraz wykazanie ujemnej korelacji pomiędzy ilością pMVs CD61+/CD62P+ a czasem jaki upłynął od wystąpienia udaru. W omówieniu badań w publikacji wynik ten jest wyjaśniony min. potencjalnym zjawiskiem wyczerpania płytek krwi krążących w naczyniach krwionośnych (ang. *exhaustion of platelets*). Czy faktycznie takie wyjaśnienie jest odpowiednie? Zjawisko wyczerpania płytek odnosi się raczej do sytuacji gdy płytki krwi słabiej reagują na działanie agonistów w testach agregacji czy w ocenie markerów powierzchniowych, a spowodowane jest to częstym kontaktem płytek z czynnikami aktywującymi w krążeniu. Efektem tych epizodów aktywacji płytek w krążeniu może być zwiększone uwalnianie antygenów z błon płytkowych do krwi. Proszę Doktorantkę o komentarz do tego zagadnienia.

4

W podsumowaniu stwierdzam, że praca doktorska lek. Justyny Rosińskiej jest bardzo wartościowa i wnosi istotne wartości poznawcze z potencjalną możliwością ich zastosowania. Rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 z późn. zm.).

Przedkładam Wysokiej Radzie Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu wniosek o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie lek. Justyny Rosińskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego i nadanie Jej stopnia naukowego doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne. Ponadto z uwagi na bardzo wysoką wartość poznawczą, oryginalne podejście metodologiczne oraz znaczenie rozwiązywanego problemu wnoszę również o wyróżnienie rozprawy doktorskiej lek. Justyny Rosińskiej właściwą nagrodą.

Łódź, 20 listopada 2019 roku

Adiunkt  
Zakład Zaburzeń Krzepnięcia Krwi  
Uniwersytet Medyczny w Łodzi  
*Błasz*  
dr hab. n. med. Bogusława Luzak