



Dr hab. Aleksandra PliszczaK-Król
Zakład Patofizjologii
Katedra Immunologii, Patofizjologii
i Prewencji Weterynaryjnej
Wydział Medycyny Weterynaryjnej
Uniwersytet Przyrodniczy
ul. C.K. Norwida 31
50 – 375 Wrocław

Wrocław, 2. 10. 2023 r.

OCENA

rozprawy doktorskiej mgr inż. Natalii Trochanowskiej-Pauk
pt. „**Metoda przedłużenia czasu przechowywania płytek krwi**”.

Niniejsza recenzja została wykonana na wniosek Rady Dyscypliny Naukowej Inżynieria Biomedyczna Politechniki Wrocławskiej.

Hemostaza jest procesem, który odpowiada za utrzymanie krwi w płynnej postaci w łożysku naczyniowym. W przypadku naruszenia integralności naczynia krwionośnego bierze ona udział w procesie naprawy uszkodzeń oraz zapobiega utracie krwi, a przez to też i innych płynów ustrojowych. Gdy zostaje naruszona integralność organizmu człowieka lub zwierzęcia, natychmiastowe uruchomienie mechanizmów hemostazy wspomaga dodatkowo niszczenie czynnika szkodliwego, neutralizowanie uszkodzonych komórek i uwolnionych substancji prozapalnych, a także naprawianie i odtwarzanie utraconych tkanek. Hemostazę tworzy wysoce zintegrowany system ściśle ze sobą współpracujących składowych, którymi są hemostaza pierwotna (hemostaza naczyniowa i hemostaza płytkowa) i wtórna (zwana też hemostazą osoczkową) oraz fibrynoliza. Dwie pierwsze tworzą układ krzepnięcia krwi. Efektem jego aktywacji jest czop hemostatyczny szczelnie zamykający uszkodzenie ściany naczynia krwionośnego - zakrzep zbudowany z fibryny i komórek krwi (głównie z płytek). Płytki krwi mają relatywnie prostą morfologię. Zagregowane w miejscu uszkodzenia, uaktywniają się i uwalniają szereg biologicznie czynnych substancji, jak np. czynniki krzepnięcia i fibrynolizy, mediatory prozapalne i modulujące odpowiedź układu immunologicznego, substancje przeciwbakteryjne oraz czynniki wzrostu. W ten sposób wywierają istotny wpływ na mechanizmy regulacyjne ustroju, procesy gojenia i regeneracji tkanek. Prawidłowe funkcjonowanie hemostazy jest ściśle uzależnione od precyzyjnej równowagi między sprawnie działającymi mechanizmami jej składowych, czynnikami je aktywującymi i hamującymi oraz relacji płytki - pozostałe komórki



krwi, komórki śródbłonna naczyń i komórki przestrzeni okołonaczyniowej. Nawet krótkotrwałe zachwianie tej równowagi może prowadzić z jednej strony do krwawień, a z drugiej do tworzenia się zakrzepów. Utrata krwi lub obecność zakrzepów w układzie krążenia prowadzi do niedokrwienia tkanek i narządów czego konsekwencją są różnego stopnia i różnej natury problemy zdrowotne. Duża dynamika (krótki czas) przebiegu mechanizmów zaburzonej hemostazy, nierzadko bywa też przyczyną nagłej śmierci z powodu braku możliwości podjęcia natychmiastowego postępowania terapeutycznego. Zaburzenia strukturalne i/lub funkcjonalne płytek krwi oraz obniżenie ich liczby, czy to w wyniku rzeczywistej utraty czy przyspieszonego zużycia, stanowią poważny problem w medycynie konwencjonalnej, regeneracyjnej i transplantacyjnej. Często z powodu obniżonej zdolności organizmu do odtworzenia na czas zniszczonej/utraconej puli tych komórek lub jej braku oraz przy braku możliwości zastąpienia jej substytutami syntetycznymi, pacjenci wymagają toczenia płytek pochodzących od dawców allogenicznych. Pozyskanie odpowiednich ilości płytek, utrzymanie ich żywotności i aktywności funkcjonalnej stanowi z kolei wielkie wyzwanie dla medycyny transfuzyjnej. Krótki czas życia płytek oraz ich duża wrażliwość na czynniki zewnętrzne, mocno ograniczają możliwości przechowywania i stosowania donatów płytkowych, a także generują ogromne straty tego cennego materiału. Jest to bardzo istotny problem, z którym często borykają się instytucje krwiodawstwa i krwiolécznictwa oraz placówki medyczne na całym świecie. Kwestię tę dostrzegła też i szczegółowo przeanalizowała Pani mgr inż. Natalia Trochanowska-Pauk. Podejmując badania przedstawione w niniejszej dysertacji, Pani mgr inż. dołączyła do niezbyt liczego grona badaczy poszukujących bardziej wydajnych i skutecznych metod przechowywania koncentratów płytkowych.

Przedstawiona do recenzji praca doktorska obejmuje 164 strony, w tym 158 stron tekstu. W rozprawie wyróżniono 8 głównych rozdziałów, tj. Wprowadzenie, Wstęp literaturowy, Teza, cel i zakres pracy, Materiały i metody, Wyniki, Dyskusja, Wnioski oraz obejmująca 222 pozycje literaturowe Bibliografia. Tekst pracy uzupełniają streszczenia w języku polskim i angielskim, spis najczęściej używanych skrótów oraz 2 załączniki (Wynik badania bakteriologicznego i opis dorobku naukowego Doktorantki). Praca, wzbogacona licznymi rycinami, wykresami, schematami, zdjęciami oraz tabelami, została napisana wg ogólnie przyjętego schematu i w poprawnym stylu. Doktorantka nie ustrzegła się jednak pewnych błędów terminologicznych, np. używa pojęcia „skrzep” na określenie czopu hemostatycznego, powstałego w wyniku przyżyciowego wykrzepienia krwi wewnątrz naczynia. W rzeczywistości jest to zakrzep. Nie powinna też mówić o „adhezji czynników krzepnięcia” (s. 19), a raczej o ich aktywacji.

We wstępie pracy Autorka przedstawiła najważniejsze zagadnienia dotyczące biologii płytek krwi oraz ich udziału w hemostazie i mechanizmach odpowiedzi immunologicznej, a także aktualny stan wiedzy nt. stosowania koncentratów płytkowych. Jako odnośniki wykorzystuje aktualne pozycje literatury naukowej, co świadczy o dobrej znajomości analizowanego problemu. Uważam jednak, że Wstęp jest zbyt obszerny, a opisy niektórych zagadnień (np. dotyczące aspektu

klinicznego krwotoku i małopłytkowości, instytucji odpowiedzialnych za pozyskiwanie i obrót krwią i materiałami krwiopochodnymi czy przepisów prawnych regulujących kwestie krwiodawstwa i krwiolecznictwa) mogłyby być znacznie uproszczone. Analogicznie, Tabela 2.4.1 przedstawiająca porównanie ilości jednostek KKP wyprodukowanych w 2018 r. w różnych krajach wydaje się być zbędna. Chciałabym zwrócić uwagę na pewne nieścisłości, jakie znalazły się w tym rozdziale. Przykładowo, fraza „*funkcją płytek krwi jest ich udział w procesie krzepnięcia i hemostazie*” wymaga uściślenia merytorycznego. Użycie spójnika **i** sugeruje przynajmniej częściową odrębność wspomnianych mechanizmów. Tymczasem mechanizm krzepnięcia w pełni wchodzi w zakres szerszej rozumianego procesu hemostazy. Podobnie, zdanie „*Do aktywacji protrombiny może dochodzić na dwa sposoby: torem wewnątrz- lub zewnątrzpochodnym*” nie jest poprawne, gdyż sugeruje, że obie drogi aktywacji istnieją niezależnie i tylko jedna z nich wystarczy do uzyskania wystarczającego stężenia tego białka. Tor wewnątrzpochodny odgrywa raczej rolę amplifikacyjną względem toru zewnątrzpochodnego, niż rolę inicjującą proces krzepnięcia. Niewłaściwe jest sugerowanie sekwencyjności czasowej aktywacji hemostazy pierwotnej i wtórnej. Oba komponenty (tworzenie agregatów płytkowych i tworzenie sieci z włókien fibryny) są natychmiast, równocześnie aktywowane w odpowiedzi na uszkodzenie ściany naczynia krwionośnego, spowolnienie przepływu czy zmiany w samej krwi. Są wzajemnym uzupełnieniem i wzmocnieniem. Ponadto, sieć fibryny nie tylko otacza zakrzep – to właśnie ona tworzy jego wewnętrzne rusztowanie, tzn. penetruje całą przestrzeń międzypłytkową zakrzepu. Schemat na rys. 2.1.2 wymaga uzupełnienia – nie umieszczono w nim czynnika VIII.

W kolejnej części rozprawy Autorka przedstawiła cel badawczy, którym było opracowanie i ocena skuteczności nowej metody pozwalającej na wydłużenie żywotności płytek krwi poprzez zastosowanie, w różnych kombinacjach, dwóch czynników: promieniowania bliskiej podczerwieni R/NIR oraz preparatu medycznego tikagrelor (inhibitora płytek krwi). Do realizacji celu wykorzystwała zarówno metody klasyczne (określanie morfologicznych parametrów płytkowych, pomiar czasów krzepnięcia i stężenia fibrynogenu), jak i nowoczesne (m. in.: oceny aktywności płytek z użyciem specyficznych przeciwciał, oceny potencjału błonowego mitochondriów czy oceny poziomu RTF z użyciem sond fluorescencyjnych). Zarówno układ doświadczenia jak i dobór metod badawczych uważam za właściwe do realizacji zamierzonego celu. Ilość różnorodnych badań, a w ich zakresie też i oznaczeń, wykonanych dla niniejszej dysertacji jest imponująca. Jednak podczas czytania tego rozdziału, można zauważyć pewne braki i nieścisłości, np.:

1. przygotowania systemu naświetlacza i doboru parametrów jego pracy Doktorantka dokonała w oparciu o wcześniej opublikowane dane. Brakuje odnośnika literaturowego do tych danych,
2. schemat prac badawczych (Rys. 4.1.1) powinien być uszczegółowiony skoro badania dotyczyły nie tylko samych płytek, ale i koncentratów jako całości (płytki wraz z medium) oraz osocza i białek w nim obecnych. Dobrze by było gdyby w panelu prawym schematu było dodane, że

- np. morfologia, zdolność agregacji, poziom stresu oksydacyjnego, przeżywalność dotyczą samych płytek, a czystość mikrobiologiczną oceniano dla koncentratu jako całości.
3. Doktorantka, dla oceny ewentualnego wpływu właściwości optycznych ściany worka do przechowywania koncentratów na moc użytego promieniowania, dokonała 5-krotnych pomiarów. Jako, że nie ma dokładniejszej informacji, pojawia się pytanie czy ściana samego worka była naświetlana w takiej samej sekwencji czasu i tak długo jak później naświetlane były koncentraty? Odpowiedź na to pytanie pozwoliłaby na ewentualne wykluczenie wątpliwości czy naświetlenie wg przyjętego schematu nie zmienia struktury chem. ściany worka, co z kolei podczas kontaktu (ściana worka – płytki) mogłoby mieć wpływ na reaktywność i żywotność płytek w badanych koncentratkach.
 4. W opisach procedur:
 - 4.1.5 odplukiwanie tikagreloru z koncentratów (schemat - Rys. 4.1.4): brakuje informacji jakie ilości KKP i leku zadawano do próbek, jaka była liczba płytek w pojedynczej próbce. Podanie tylko ostatecznego stężenia leku też jest niewystarczające. Nie jest wiadomym czy badanie było wykonane dla wszystkich trzech, wcześniej wspomnianych KKP (str. 69-70) czy tylko dla jednego wybranego. Używanie KKP i PRP zamiennie jest nie do końca właściwe, bo to nie jest to samo.
 - 4.1.6 badania działania synergistycznego tikagreloru oraz promieniowania R/ NIR (schemat - Rys. 3.1.5, a powinno być chyba Rys. 4.1.5): zamiast wzmianki o całkowitej pojemności próbki typu eppendorf, bardziej wartościowe byłoby podanie jakie ilości KKP i leku zadawano do próbek, jaka była liczba płytek w pojedynczej próbce.
 - 4.1.7 ocena skuteczności metody ochrony płytek krwi: brakuje informacji dlaczego w poszczególnych grupach doświadczalnych liczba badanych koncentratów była różna. Str. 76 wers 22: „ocenę morfologii KKP” proponuję zamienić na bardziej właściwą *ocenę liczebności i morfologii płytek w KKP*.
 - 4.1.3.1 całkowita pojemność antyoksydacyjna (str. 79): czy nie za szybko Doktorantka już w rozdziale dotyczącym materiałów i metod stwierdza, że „*W czasie przechowywania KKP dochodzi do zaburzeń równowagi oksydacyjno-antyoksydacyjnej. Zastosowane w badaniach metody ochrony płytek krwi – promieniowanie R/NIR oraz tikagrelor – wykazują właściwości antyoksydacyjne*”?
 - 4.2.3.2 stopień utleniania lipidów (str. 81): grupa K powinna być uwzględniona też w Tabeli 4.2.2.
 - 4.2.6.1 czasy krzepnięcia: obecnie nie używa się już nazwy czas kaolinowo-kefalinowy dla aPTT lecz czas częściowej tromboplastyny po aktywacji. Wersy 22 – 24 (str. 86): zdanie „*PT natomiast określa czas potrzebny do wytworzenia skrzepu po dodaniu jonów wapnia oraz aktywatora zewnętrznego szlaku krzepnięcia (tromboplastyny)*” jest niezrozumiałe (błędne). Prawdopodobnie Doktorantka miała na myśli nie PT lecz aPTT ze względu na dodanie jonów Ca^{+2} i dodatkiem były koloidalny krzem i fosfolipidy a nie tromboplastyna.
 - Doktorantka, w procedurach badawczych często używała roztworu zbuforowanej soli fizjologicznej (PBS). Nie wspomniała jednak, którego rodzaju roztworu używała. Jest to

istotne, bowiem często w różnych oznaczeniach, aby nie zmieniać reaktywności płytek czy białek osocza biorących udział w hemostazie, powinno używać się raczej PBS bez Ca^{+2} i Mg^{+2} .

Kolejny rozdział dysertacji poświęcony jest opisowi uzyskanych wyników. Dominującą formą ich przedstawienia są wykresy. Niewątpliwie Doktorantka poświęciła im niezmiernie dużo pracy i czasu. Są naprawdę starannie wykonane. Ale niektóre z nich są też wymagające dla czytającego, ponieważ duże odstępstwa pomiędzy głównymi jednostkami na osiach wykresów (np. Rys. 5.4.2), przy braku podania konkretnych wartości zmusza do raczej domyślania się jaka jest właściwa wartość wyniku. Z tekstu natomiast, częściej można się dowiedzieć iż wartości badanych parametrów wzrosły lub obniżyły oraz przy jakich poziomach istotności pojawiały się różnice statystyczne gdy porównywać je ze sobą. Jest to niewątpliwie ważne. Jednak prowadzący badania z zakresu biologii czy medycyny często stają przed dużymi ograniczeniami obserwując iż np. bardzo wyraźne efekty (objawy kliniczne) oddziaływania czynników modulujących istotne dla doświadczenia są pomijane lub wręcz lekceważone ze względu na brak istotnych różnic statystycznych. Okazuje się bowiem, że nawet badania prowadzone *in vitro*, ale z użyciem żywych komórek czy organów mogą zakończyć się nie do końca przewidywalnymi wynikami. Doktorantka spotkała się z tym samym dylematem chociażby analizując zmiany dotyczące stresu oksydacyjnego na podstawie uwalniania przez płytki RFT (Rozdz. 5.4.2.2). Na wykresie widoczne są ewidentne zmiany w ilości wydzielanych RTF w zależności od tego jakie czynniki modulujące zostały użyte i od czasu ich oddziaływania, choć analiza statystyczna nie wykazała różnic pomiędzy grupami doświadczalnymi. Dlatego, trochę szkoda, że część wyników nie została przedstawiona sposób bardziej bezpośredni, w postaci np. średnich, odsetków, jednostek co wiele by ułatwiło. Dodatkowo, gdyby zostały przedstawione punkty odniesień (punkty odcięcia) dla tych wyników można by było uniknąć pewnych wątpliwości i nieścisłości.

Niejasne są:

➤ opis wyników dotyczących możliwości przywrócenia zdolności płytek do agregacji po odpłukaniu tikagreloru zamieszczony w tekście i w odpowiedniej do niego tabeli (Tabela 5.1.1.) powinien być zaopatrzony w informację, iż odsetek płytek agregujących w próbkach kontrolnych stanowił 100, do których następnie zostały odniesione odsetki płytek agregujących po odpłukaniu leku. W przeciwnym wypadku pojawia się dysonans między opisem a zawartością tabeli, który dodatkowo pogłębiają stanowcze stwierdzenia, iż po podaniu leku agregowały na poziomie 1% tylko płytki pozyskane przez aferezę, zawieszona w osoczu naturalnym, podczas gdy płytki w dwóch pozostałych KKP takiej zdolności nie posiadały oraz, że po odpłukaniu leku zdolność do agregacji odzyskały tylko płytki z aferezy, zawieszona w SSP+ i tylko na poziomie 50%. Zastanawia niski odsetek płytek agregujących w próbce kontrolnej KKP konwencjonalnego - czy jest to związane ze znikomą liczbą płytek w koncentracji lub może z ich obumarciem czy silnym hamowaniem ich aktywności? W podsumowaniu, wniosek 3 budzi wątpliwości ponieważ na podstawie danych z tabeli to wyższy odsetek agregacji wykazywały płytki z aferezy, zawieszona w osoczu naturalnym.

➤ zasadność przeliczania liczby płytek i ich receptorów na μmole ,

➤ dlaczego w Tabeli 5.3.1, zbierającej wyniki dotyczące agregacji płytek pozostających pod wpływem NIR i/lub tikagreloru, nie zostały zamieszczone wartości dla agregacji w grupie kontrolnej. Teoretycznie, przy analizie porównawczej grup doświadczalnych, informacji o niej można by zaczerpnąć z Tabeli 5.1.1 ale rozbieżność wyników dla leku przedstawionych w obu tabelach sugeruje, że były to dwa odrębne badania. W dalszej części opisu wyników (str. 100,



wersy: 2-4) istnieje zdanie, które niepokoi: „W przypadku KKP pobranych metodą aferezy i zawieszonych w SSP+ oraz KKP pobranych metodą konwencjonalną także zawieszonych w SSP+ agregacji pod wpływem ADP nie obserwowalam zupełnie (była na poziomie 0%)”. Czyżby to była wzmianka o grupie kontrolnej? Jeżeli tak, to opis relacji porównawczej grupa kontrolna - grupy doświadczalne powinien być inny.

➤ Doktorantka wspomniała, że przy użyciu cytometru przepływowego szacowany był odsetek płytek niedojrzałych (str. 102, wersy: 9-10). Nie ma żadnych informacji na ten temat o tym w materiałach i metodach.

➤ dlaczego wyniki pomiarów zdolności płytek do agregacji we wcześniejszej części dysertacji były przedstawiane w % (Tabela 5.1.1, Rys.5.1.1 oraz Tabela 5.3.1) a w późniejszej już w j.u (Rys. 5.4.6)? Dodatkowo zastanawia analiza wyników pomiaru zdolności agregacji opisana w tekście (str. 106, wersy: 11-13 i str. 107, wersy: 3-6) w % w zestawieniu z wynikami tego samego pomiaru przedstawionymi na wykresie (Rys.5.4.6) w j.u. Szkoda, że nie została zamieszczona informacja o bezpośredniej relacji % - j.u.,

➤ w czym były mierzone stężenie glukozy i całkowita pojemność antyoksydacyjna. W koncentratkach płytkowych (KKP) czy osoczach ubogopłytkowych (PPP)? (Podrozdz. 5.4.3.4 i 5.4.3.5).

W rozdziale Wyniki nie są już potrzebne opisy sposobu wykonywania badań i oznaczania badanych parametrów.

W rozdziale Dyskusja Doktorantka przedstawiła podsumowanie i interpretację otrzymanych wyników. Do analizy swoich wyników, bez konfrontowania ich z wynikami podobnych badań innych autorów nie powinny być zamieszczane odnośniki do pozycji literaturowych, np. str.122 wersy: 4-5, 20-21. Niepotrzebne jest też ponowne opisywanie procedur wykonywania badań, np. str. 123 wersy: 9-31, str. 125-126. Trochę zbyt śmiało wydaje się stwierdzenie „Efekt działania promieniowania bliskiej podczerwieni na płytki krwi w zakresie hamowania ich agregacji występuje dla wszystkich agonistów, z czego wynika, że R/NIR zaburza procesy aktywujące układ krzepnięcia na poziomie dostępnym dla wszystkich receptorów”. W badaniach zastosowane były tylko ADP, kolagen i trombina, a ich oddziaływanie nie obejmuje wszystkich receptorów obecnych na płytkach. Dlatego proponuję, aby przy redagowaniu pracy do publikacji uściślić: dla wszystkich zastosowanych w doświadczeniu agonistów oraz na poziomie specyficznych dla nich receptorów. Wzrostu liczby płytek obserwowanego w KKP naświetlanych NIR nie powinno się interpretować na podstawie znanego już wpływu tego typu promieniowania na megakariocyty. Prawdopodobieństwo obecności tych prekursorów w KKP jest znikome ze względu na to iż u zdrowych dawców komórki te nie są obecne we krwi krążącej. Pojawia się więc pytanie czy użyte do badań KKP były weryfikowane na obecność megakariocytów? W interpretacji wspomnianego efektu nie powinien być też być przytaczany argument, iż „naświetlanie R/NIR całego ciała myszy zwiększało wytwarzanie płytek krwi”, bowiem badania miały charakter *in vitro*, więc nie było tu naświetlania szpiku kostnego czerwonego – głównego producenta płytek. Na str. 132 rozprawy można znaleźć sformułowanie „...czas tworzenia tromboplastyny (aPTT) oraz trombiny (PT)...”. Są one błędne. APTT jest to czas tworzenia się zakrzepu w wyniku wzmocnienia mechanizmu krzepnięcia przez czynniki kontaktu (m. in.



czynnik XIIa). Wartość APTT pozwala ocenić sprawność toru wewnątrzpochodnego i toru wspólnego krzepnięcia osoczkowego. PT to czas tworzenia się zakrzepu zainicjowany przez kompleks TF-czynnik VII. Wartość PT pozwala ocenić sprawność toru zewnątrzpochodnego i toru wspólnego krzepnięcia osoczkowego.

Wszystkie (bardzo liczne) pozycje zestawione w Bibliografii zostały wymienione w odpowiednich częściach pracy co świadczy, że Doktorantka swobodnie posługuje się zdobytą w nich wiedzą.

Należy jeszcze wspomnieć, już bez wdawania się w szczegóły, iż w pracy można zauważyć, choć nieliczne, błędy edycyjne typu: brak pojedynczych słów, brak liter w niektórych słowach, podwójne spacje czy ich brak oraz brak pełnych nazw dla niektórych zastosowanych skrótów. Należy jednak podkreślić, że w żaden sposób nie wpływa to na jej wartość merytoryczną.

Podsumowując, mimo powyższych wydawałoby się licznych uwag, dysertację doktorską pani mgr inż. Natalii Trochanowskiej-Pauk oceniam bardzo pozytywnie. Posiada ona duże walory poznawcze i wartość aplikacyjną. Doktorantka wykazała wielkie zaangażowanie i swoim badaniom poświęciła wiele czasu. Przyjęty cel pracy realizowała konsekwentnie, wykorzystując nowoczesne metody badawcze. Dobrze opanowała techniki pracy laboratoryjnej. Jest przygotowana do pracy naukowej. Potrafi wytyczyć cel badawczy, zaplanować odpowiedni układ doświadczalny i go realizować, zebrać i przeanalizować otrzymane wyniki a z analizy wyciągnąć odpowiednie wnioski.

Stwierdzam, że rozprawa doktorska Pani mgr inż. Natalii Trochanowskiej-Pauk pt. „Metoda przedłużenia czasu przechowywania płytek krwi” spełnia warunki określone w art. 179 ust. 2 i 3 pkt 2 lit. b ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r., poz. 1669) i wnioskuję o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Wrocław, 2.10.2023 r.

Dr hab. Aleksandra PliszczaK-Król