

*Prof. dr hab. Krzysztof Gwoździński*  
*Katedra Biologii Nowotworów i Epigenetyki*  
*Uniwersytetu Łódzkiego*

## Ocena

### rozprawy doktorskiej mgr inż. Katarzyny Galeckiej

**pt. „Fizjologiczne parametry płytek krwi w procesie hemodializy zwierząt i ich zmiany wywołane promieniowaniem z zakresu bliskiej podczerwieni (NIR) ”** wykonanej w na Wydziale Podstawowych Problemów Techniki, Politechniki Wrocławskiej pod kierunkiem Pani Prof. dr hab. Małgorzaty Komorowskiej i Pana dr hab. inż. Jerzego Detyny.

Wyniki badań epidemiologicznych związanych z występowaniem przewlekłej choroby nerek (PChN), określanej wcześniej jako przewlekłej niewydolności (PNN) w skali globalnej, wykazały, że PChN występuje w granicach 9-15% badanej populacji. Natomiast w Polsce szacuje się występowanie tej choroby na poziomie 11% populacji, czyli stanowi ok. 4 mln mieszkańców naszego kraju.

Dializy są zabiegami, które stosowane są u chorych z przewlekłą chorobą nerek. Hemodializa i dializa otrzewnowa zastępują pracę uszkodzonych nerek, a ich celem jest usuwanie z organizmu produktów przemiany materii, toksyn mocznicowych, soli oraz wody. W przypadku hemodializ najważniejszym elementem sztucznej nerki jest dializator, który jest filtrem zawierającym drobne włókna w postaci kapilar. Ściany kapilar stanowią półprzepuszczalną błonę dializacyjną. Wewnątrz kapilar przepływa krew, a na zewnątrz błony w przeciwnym kierunku roztwór dializacyjny. Małe i średniej wielkości cząsteczki dyfundują z krwi do płynu dializacyjnego.

Rozprawa doktorska mgr inż. Katarzyny Galeckiej jest częścią badań prowadzonych od wielu lat w zespole Pani Profesor Małgorzaty Komorowskiej, związanych z zastosowaniem promieniowania w zakresie bliskiej podczerwieni (NIR) na strukturę i funkcję komórek krwi.

W swojej pracy doktorskiej Doktorantka badała wpływ promieniowania NIR na właściwości płytek krwi (PL) owiec w czasie hemodializ. Badania takie mają nie tylko znaczenie poznawcze, ale również aplikacyjne, bowiem płytki krwi są komórkami ważnymi w utrzymaniu hemostazy oraz



tworzeniem skrzepów w przypadku uszkodzonych naczyń krwionośnych, ale również w przypadku kontaktu ze sztuczną powierzchnią.

Struktura rozprawy doktorskiej ma typowy układ ogólnie przyjęty dla prac doktorskich, czyli zawiera streszczenie w językach: polskim i angielskim, część teoretyczną, cele pracy, materiały i metody, wyniki, dyskusję i wnioski końcowe. Ponadto, Autorka zamieściła cztery załączniki.

W dość obszernej części teoretycznej, Doktorantka przedstawił aktualny stan wiedzy, który miał związek z realizowaną pracą doświadczalną. Błona dializacyjna ma kluczowe znaczenie w kontakcie z przepływającą krwią. Niska biokompatybilność błon celulozowych prowadzi do aktywacji komórek fagocytujących, które w odpowiedzi uwalniają duże ilości reaktywnych form tlenu. Szczególnie silnie efekt ten występuje w 15 min hemodializy i określa się go jako wybuch tlenowy. W związku z powyższym Autorka omówiła metody umożliwiające minimalizację tego zjawiska.

Następnie przedstawiła właściwości i funkcję płytek krwi, które nie tylko uczestniczą w hemostazie i krzepnięciu, ale również w utrzymaniu i regulacji napięcia naczyniowego, w stanach zapalnych, obronie gospodarza przed infekcjami, a także w procesach nowotworowych. Dużo miejsca poświęciła zjawisku adhezji białek do powierzchni, szczególnie fibrynogenu. Kolejnym zagadnieniem była adhezja płytek do powierzchni z uwzględnieniem mechanizmów związanych z udziałem receptorów glikoproteinowych (GPIb, GPIIb/IIIa, GPIa/IIa), które również uczestniczą w wiązaniu wielu białek, takich jak fibrynogen, fibronektyna, witronektyna oraz czynnik von Willebranda. Doktorantka omówiła także wpływ adhezji płytek na zmianę ich morfologii, opisując dokładnie mechanizmy z tym związane. Informacje te pochodzą z właściwie dobranego piśmiennictwa.

W dalszej części pracy opisała hemodializę jako główną metodę pozaustrojowego oczyszczania krwi pacjentów, opisując konsekwencje oddziaływania krwi z błonami dializacyjnymi, w tym płytek krwi.

Kolejnym omawianym zagadnieniem był wpływ promieniowania podczerwonego na komórki krwi, w tym strukturę i właściwości płytek krwi.

*Cele rozprawy doktorskiej* zostały przedstawione przejrzyście i dotyczyły badania wpływu promieniowania bliskiej podczerwieni na płytki krwi (*ex vivo*) zwierząt doświadczalnych w czasie wielokrotnych hemodializ. Aby zrealizować postawione cele, Doktorantka musiała zastosować odpowiedni model zwierzęcy (owce), choć nie uzasadniła dlaczego właśnie taki. Dodatkowo musiano u zwierząt dokonać nefrektomii. Domyślam się, że dokonano tego w ramach współpracy z

Wojewódzkim Szpitalem Specjalistycznym we Wrocławiu, uzyskując wcześniej zgodę odpowiedniej Komisji bioetycznej.

W rozdziale „*Materiały i metody*” Doktorantka omówiła przeprowadzoną obustronną nefrektomię, żylny dostęp do hemodializy, aparat do hemodializy z dializatorem wyposażonym w błony polisulfonowe oraz roztwór dializacyjny. Cała procedura hemodializy była przeprowadzona analogicznie jak w przypadku standardowych zabiegów u pacjentów z PChN. Krew pobierana była na początku hemodializy, w 15 min zabiegu, kiedy dochodzi do najsilniejszej odpowiedzi komórek na stres wywołany przez ich kontakt z błoną dializacyjną oraz na koniec zabiegu. Ponadto, w celu porównania wpływu błony dializacyjnej, próbki krwi pobierane były przed dializatorem i za dializatorem. Na przedstawionym schemacie (Rys. 4) nie zaznaczono kierunku przepływu krwi. W przypadku badania wpływu NIR na krew, emitory podczerwieni były umieszczone po obu stronach dializatora (Rys. 8), a użyte materiały (dializator i dreny) były przezroczyste dla promieniowania NIR.

W badaniach właściwości agregacyjnych płytek krwi zastosowano metodę impedancyjną opartą na pomiarze oporu elektrycznego. Metoda ta umożliwia badanie agregacji płytek w pełnej krwi. Kolejną metodą pomiaru agregacji płytek była spektroskopia EPR z wykorzystaniem sondy spinowej 16-DSA (kwasu 16-doksylostearynowego), który ulega inkorporacji do zewnętrznej monowarstwy badanych komórek. Ponieważ w badaniach Doktorantka używała osocza bogatopłytkowego dokonała również znakowania albuminy tą samą sondą. Widmo EPR sondy 16-DSA w izolowanych płytkach jest trypletem, natomiast albuminy widmem złożonym (anizotropowym). Podejście takie było bardzo istotne, bowiem płytki krwi w osoczu bogatopłytkowym opłaszczane są albuminą, zatem otrzymane widmo EPR jest sumą sygnału pochodzącego od płytek krwi i albuminy. Jednakże w przeprowadzonych badaniach Doktorantka nie uwzględniła lipoprotein (LDL, HDL, VLDL) osocza, które również ulegają znakowaniu w osoczu bogatopłytkowym i wnoszą swój udział w całkowitym sygnale EPR. Natomiast nie ulega wątpliwości, że to płytki adherują do powierzchni szkła kapilar pomiarowych, co ma związek z obserwowanym wzrostem parametru  $h_{+1}/h_0$  wyznaczonym z widma EPR odzwierciedlającym zmiany płynności błony komórkowej w czasie.

Zmiany w morfologii płytek krwi w kontakcie ze szkłem Autorka potwierdziła stosując mikroskopię optyczną z kontrastem fazowym. Proces ten przebiega w trzech etapach: wczesny etap adhezji z charakterystycznymi wypustkami (pseudopodiami), stan całkowitego rozpostarcia oraz tworzenie agregatów. Zmiany kształtu dobrze korespondowały ze wzrostem parametru  $h_{+1}/h_0$ .

Stosując kapilary pomiarowe z tworzywa TPX (polimetylopten) Doktorantka udowodniła brak zmian w stosunku  $h_{+1}/h_0$  widma EPR w czasie, co świadczy o braku aktywacji płytek krwi i adhezji do powierzchni.

Proces adhezji i aktywacji płytek krwi na powierzchni szkła wymaga jonów wapnia. Autorka pokazała, że antykoagulant EDTA będący również czynnikiem chelatującym jony  $Ca^{2+}$  istotnie obniżał adhezję płytek krwi, ale nie jej całkowite zahamowanie. Widma EPR płytek krwi obserwowane w czasie z tym chelatorem charakteryzowały się wyższą płynnością błon komórkowych. Z kolei obserwacje mikroskopowe potwierdziły obniżoną adhezję z przewagą form z pseudopodiami. Według mojej opinii cały rozdział 4.5 opisany powyżej powinien być umieszczony w rozdziale *Wyniki badań*, bowiem pokazuje wstępne rezultaty otrzymane, przy użyciu stosowanych metod.

Biorąc pod uwagę postawione cele badań oraz potrzebę porównania ze sobą wielu zmiennych, Doktorantka zastosowała różnorodne metody statystyczne, takie jak jednoczynnikowa, wieloczynnikowa i wielowymiarowa analiza wariancji (ANOVA, MANOVA), testy Levene'a i Tukeya i inne.

Rozdział *Wyniki badań* otwiera opis doboru zwierząt doświadczalnych, w którym wykorzystano niehierarchiczną analizę skupień dla grupy kontrolnej zwierząt oraz grupy naświetlanej NIR. Następnie Doktorantka dokonała analizy zmian, które miały miejsce w czasie hemodializ uwzględniając punkty pobrania krwi oraz czas na podstawie wyników wszystkich przeprowadzonych dializ. Dokonana analiza wykazała, że wraz z czasem dializy następuje osłabienie odpowiedzi płytek na działanie ADP (agonista), szczególnie po 15 min krążenia pozaustrojowego. Z kolei znacznie większe różnice w płynności błony komórkowej obserwowano pod koniec hemodializy w porównaniu z jej rozpoczęciem.

Kolejną analizą przeprowadzoną przez Autorkę było porównanie między grupą kontrolną i naświetlaną w czasie pojedynczej hemodializy z uwzględnieniem 10 przeprowadzonych zabiegów oraz miejsca pobrania próbek (przed dializatorem i po). Na początku dializy próbki naświetlone pobrane przed i za dializatorem wykazywały silniejszą odpowiedź na działanie agonisty (nawet o 40%) w porównaniu z grupą kontrolną. Natomiast w trakcie hemodializy odpowiedź płytek ulegała osłabieniu w obu grupach badawczych już po 15 min. Ponadto płytki naświetlone w porównaniu z kontrolnymi silniej reagowały na działanie agonisty w końcowej fazie hemodializy. W obu grupach badawczych obserwowano podobny spadek płynności błon plazmatycznych PL zarówno przed, jak i za dializatorem. W płytkach kontrolnych w próbce przed dializatorem nie obserwowano zmian na działanie kolagenu w początkowym czasie oraz w trakcie i końcu dializy. Natomiast w płytkach

naświetlonych obserwowano spadek ich aktywności po działaniu tego agonisty. Podobny efekt po działaniu kolagenu obserwowano w próbkach pobranych za dializatorem.

Doktorantka dokonała również analizy różnic między grupą kontrolną i naświetloną podczas wszystkich przeprowadzonych dializ (od 1 do 10). W odpowiedzi na ADP obserwowano spadek właściwości agregacyjnych płytek w grupie kontrolnej, a następnie ich wzrost od 7 dializy. Ten efekt był lepiej widoczny w przypadku grupy naświetlonej NIR. Promieniowanie z tego zakresu polepszało właściwości agregacyjne płytek. Podobne zachowanie płytek występowało w przypadku kolagenu, ale zmiany te były bardziej widoczne zarówno w grupie kontrolnej, jak i naświetlonej w porównaniu z ADP. Zmiany agregacyjne płytek w próbkach naświetlonych były bardziej pogłębione. Badając płynność błon plazmatycznych płytek w kolejnych hemodializach Doktorantka wykazała wzrost tego parametru w grupie kontrolnej do 7 zabiegu, a następnie spadek płynności, chociaż wartość ta nie wracała do wyników z pierwszej dializy. Podobną tendencję, ale silniejszą wykazywała grupa naświetlona NIR. Wyniki te korelowały z wcześniej obserwowanym spadkiem, a następnie wzrostem właściwości agregacyjnych płytek.

W dalszej części pracy Doktorantka poddała analizie różnice występujące między grupą kontrolną i naświetloną w kolejnych hemodializach w próbkach pobranych przed i za dializatorem. W przypadku grupy kontrolnej przed dializatorem stałe właściwości agregacyjne stymulowane kolagenem utrzymywały się do czwartej hemodializy, potem następował ich spadek (5, 6 dializa), następnie wzrost. Podobny przebieg obserwowany był w grupie naświetlonej, ale niski poziom właściwości agregacyjnych utrzymywał się na stałym poziomie w dializach 5,6,7,8. Wzrost natomiast był mniejszy w próbkach naświetlonych. Inny przebieg otrzymała Doktorantka stosując do stymulacji płytek ADP. Zasadniczo właściwości płytek kontrolnych nie zmieniały się w kolejnych dializach, a jedynym wyjątkiem była szósta dializa, w której następował spadek właściwości agregacyjnych. Natomiast w dializach, kiedy krew była naświetlana NIR w pierwszej hemodializie płytki wykazywały dużą aktywność agregacyjną, która spadała prawie o połowę w 2, 3 i 4 osiągając minimum w 5 dializie. W dializach 6, 7, 8, 9 następował powolny wzrost ich właściwości agregacyjnych osiągając najwyższą wartość w dializie 10, choć była ona niższa niż w dializie 1. Analiza płynności błon komórkowych płytek powolny ich wzrost z kolejną dializą osiągając maksimum w 7 dializie, a następnie spadek. W próbkach naświetlonych wzrost był bardziej regularny z kolejną dializą a maksimum pojawiało się również w 7 dializie.

Doświadczenia na płytkach przeprowadzone przed dializatorem zostały powtórzone na próbkach pobranych za dializatorem. Nie bardzo rozumiem dlaczego rysunki przedstawiające wyniki badań płytek stymulowanych agonistami oraz pomiar płynności błon zostały umieszczone w

Załączniku 4, a nie w rozdziale 5.5. W próbkach pobudzanych kolagenem obserwowano powolny spadek ich właściwości agregacyjnych aż do 7 dializy, a następnie tendencję wzrostową. Podobny przebieg zmian we właściwościach agregacyjnych płytek obserwowano w próbkach naświetlonych, ale był on znacznie bardziej wyrazisty z powodu mniejszego odchylenia standardowego. W próbkach pobudzanych ADP nie obserwowano zmian we właściwościach płytek w kolejnych trzech dializach. Spadek następował w dializach 4, 5, 6, a następnie wzrost. W próbkach naświetlonych spadek aktywności pojawił się już w drugiej hemodializie osiągając minimum w 4 dializie. Kolejne dializy to lekki wzrost, a w 8 obniżenie, a w 9 i 10 ponowny wzrost. W przypadku płynności błon plazmatycznych płytek kontrolnych Doktorantka obserwowała wzrost ich płynności z maksimum w czwartej dializie. Natomiast najmniejszą płynność odnotowała w dializie 5. W 6 dializie nastąpił wzrost, który utrzymywał się do 10 dializy. W próbkach naświetlonych w drugiej dializie nastąpił spadek, a następnie wzrost aż do 6 dializy. Wartość maksymalna była kontynuowana aż do 10 dializy. Jednakże wartości płynności obarczone były dużym odchyleniem standardowym. Doktorantka obserwowała również zmiany parametru nasyceniowego widm EPR. Zarówno w próbkach kontrolnej oraz naświetlonej NIR do 7 hemodializy następował wzrost tego parametru, który utrzymywał się przy drobnych fluktuacjach do 10 hemodializy. W przypadku próbek naświetlonych mniejszy był rozrzut wyników.

W rozdziale *Dyskusja* Doktorantka podsumowuje rezultaty otrzymane w części doświadczalnej. Mimo, że rozdział ten napisany jest rzeczowo, brakuje mi tutaj konfrontacji z rezultatami otrzymanymi przez innych autorów, nawet z tego samego ośrodka. Informacje te można natomiast znaleźć w części teoretycznej pracy szczególnie w podrozdziałach 2.4.2, 2.5.1 i 2.5.2.

Niewątpliwym osiągnięciem Autorki jest pokazanie, że płytki krwi poddane działaniu promieniowania NIR zachowują wyższą aktywność przed wejściem do dializatora i po jego opuszczeniu zachowując swoje właściwości, ale są również w lepszej kondycji po 10 zabiegach hemodializy.

Dodatkowo, Autorka umieścił w niej zdjęcia dializatorów stosowanych w dializach kontrolnych oraz po naświetleniu NIR. Zdjęcia te jednoznacznie potwierdzają, że napromieniowanie krwi ogranicza powstawanie skrzepów we krwi w czasie zabiegów hemodializ. Chciałbym dodać, że problem ten występuje podczas hemodializ pacjentów PChN. Ponadto, każda dializa upośledza strukturę i funkcję elementów morfotycznych oraz białek osocza. Uszkodzenia komórek krwi wynikają nie tylko z braku biokompatybilnych błon dializacyjnych, choć są one coraz lepsze, ale również z użycia pomp perystaltycznych, które w sposób mechaniczny uszkadzają komórki krwi. Z drugiej strony hemodializy są zabiegiem przedłużającym życie pacjentów z PChN.

Podsumowaniem wyników są liczne wnioski wyciągnięte na podstawie własnych badań, które Autorka umieściła w dwóch tabelach.

Niektóre moje uwagi, które nasunęły się podczas czytania umieszczone zostały w tekście. Poniżej przedstawiłem inne.

Mimo, że rozprawa jest napisana dobrym językiem polskim i naukowym oraz zredagowana bardzo starannie to Autorka nie uchroniła się przed popełnieniem kilka błędów:

str. 13 nazwa ATP podana jest właściwie i Autorka niepotrzebnie wprowadziła nazwę niewłaściwą (historyczną)

str. 16 brak skrótu TPX i nazwy chemicznej

str. 27, 28, 30 mostki siarczkowe

str. 65 „...reagujących na kwas barbiturowy....”

str. 67 skróty Cox i STx

str. 77 czy rzeczywiście Doktorantka opracowywała metodykę nefrektomii? Czy dodatkowo trzeba było uzyskać model mocznicy u zwierząt doświadczalnych?

str. 79 alkaliczny dwuwęglan

str. 80 brak zaznaczonego kierunku przepływu krwi, a ma to ogromne znaczenie

str. 91, rys. 18 brak osi rzędnych odzwierciedlającej stężenie jonów wapnia

str. 92, rys. 19, który dotyczy parametru  $h_{-1}/h_0$ . Zaznaczona wartość  $A_n$  może sugerować stałą rozszczepienia nadsubtelnego widma w spektroskopii EPR.

Doktorantka nie ustrzegła się również żargonu laboratoryjnego stosując nazwy: „...niskocząsteczkowych substancji...” lub „...małocząsteczkowych substancji...”. W całej rozprawie in vivo i in vitro powinny być zapisane kursywą. Brak jest opisu parametrów zamieszczonych w tabelach. Znalazłem również kilka literówek.

Jaka była idea umieszczenia rysunków 28, 29, 30, 31, 36,37, 38, 39, 40 ponownie w Załącznikach pod innymi numerami?

Wyżej wymienione uwagi i komentarze nie obniżają wartości pracy, a mogą być użyteczne dla Autorki przy opracowaniu kolejnych publikacji.

Badania prowadzone przez mgr Katarzynę Gałęcką mają nie tylko duże znaczenie poznawcze, ale również aplikacyjne. Dostarczają wielu nowych informacji o właściwościach płytek

krwi, szczególnie po napromieniowaniu NIR w czasie hemodializ. Metoda ta mogłaby być wprowadzona do standardowych hemodializ pacjentów z PChN. Ponadto, kolejnym jej praktycznym zastosowaniem są przechowywane koncentraty krwi lub osocza bogatopłytkowego.

Na uwagę zasługuje aktywność publikacyjna Autorki, która uczestniczyła w 8 publikacjach. Połowa z nich pochodzi z ostatnich lat i świadczy o aktywności naukowej Doktorantki. Ponadto jest również współautorem patentu i 22 komunikatów prezentowanych na zjazdach międzynarodowych i krajowych.

Ważnym wydarzeniem w życiu naukowym Doktorantki było uczestnictwo w dwóch projektach badawczych: Wrovasc-Program Operacyjny Innowacyjna Gospodarka, Badania i rozwój Nowoczesnych Technologii oraz MNiSW NR13 0018 06.

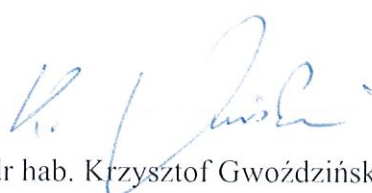
Rozprawa doktorska mgr inż. Katarzyny Gałęckiej jest dziełem o oryginalnym rozwiązaniu problemu naukowego, a realizacja postawionych celów badań świadczy o Jej dużym wkładzie pracy. Ponadto, Doktorantka wykazała dużą wiedzę oraz kompetencje do samodzielnego planowania i prowadzenia badań naukowych. Świadczy to o dobrym Jej dobrym przygotowaniu jako badacza, co również jest niewątpliwą zasługą promotorów, Pani Profesor dr hab. Małgorzaty Komorowskiej oraz Pana dr hab. Jerzego Detyny.

Podsumowując, uważam, że rozprawa doktorską mgr inż. Katarzyny Gałęckiej spełnia wszelkie wymogi stawiane pracom doktorskim określonym w art. 13 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o tytułach i stopniach naukowych oraz o stopniach i tytułach w zakresie sztuki (Dz. Ust. Nr 65, poz. 595; z 2005 r. Nr. 164, poz. 1365, z 2010 Nr. 96, poz. 620, Nr. 182, poz. 1228, z 2011 r. Nr.84, poz. 455) dla rozpraw na stopień doktora.

Biorąc pod uwagę ocenę pracy, jej poziom metodyczny i merytoryczny oraz wartość ze względu na aktualną tematykę badań i walory aplikacyjne, zwracam się do Wysokiej Rady Wydziału Podstawowych Problemów Techniki, Politechniki Wrocławskiej o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie mgr inż. Katarzyny Gałęckiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Składam również wniosek o wyróżnienie pracy stosowną nagrodą Jego Magnificencji Rektora Politechniki Wrocławskiej.

Łódź, 19 czerwca 2023



Prof. dr hab. Krzysztof Gwoździński