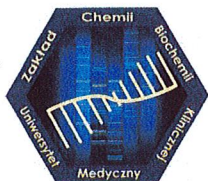




UNIwersytet  
MEDYCZNY  
W ŁODZI



Łódź, 23.09.2021 r.

Prof. dr hab. n. med. Ireneusz Majsterek  
Kierownik Zakładu i Katedry  
Zakład Chemii i Biochemii Klinicznej  
Katedra Chemii i Biochemii Medycznej  
Uniwersytet Medyczny w Łodzi

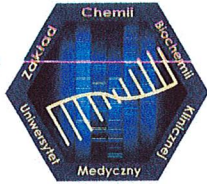
### **Recenzja pracy doktorskiej**

mgr Angela Dziejczak

Molekularne mechanizmy wzmożonej aktywności pro-zakrzepowej płytek krwi  
w stwardnieniu rozsianym

Praca doktorska wykonana pod kierunkiem

Promotor: prof. dr hab. Joanna Saluk-Bijak



Stwardnienie rozsiane (ang. *Multiple Sclerosis*, MS) jest przewlekłą chorobą zapalną ośrodkowego układu nerwowego (OUN), charakteryzującą się demielinizacją włókien istoty białej, spowodowaną rozpadem otoczki mielinowej w wyniku uszkodzenia rozpuszczalnego, zasadowego białka mieliny. Stwardnienie rozsiane jest chorobą charakteryzującą się zmiennym przebiegiem klinicznym oraz zróżnicowanym obrazem patofizjologicznym, obejmującym m.in. zaburzenia naczyniowe związane z utratą integralności BBB (ang. *Brain-Blood Barrier*). MS jest chorobą heterogenną o bardzo zmiennym przebiegu klinicznym oraz zróżnicowanym obrazie patofizjologicznym, będącą składową wielu toczących się procesów, w tym stanu zapalnego, demielinizacji, niszczenia aksonów i neuronów, jak również naprawczych mechanizmów demielinizacyjnych. MS wciąż pozostaje chorobą o niejednoznacznie określonej etiologii, ale za kluczowy patomechanizm rozwoju tego schorzenia uznaje się zaburzenia funkcji układu odpornościowego połączone ze wzrostem przepuszczalności bariery krew-mózg. Jednakże, pomimo faktu że MS ma podłoże typowo neurozapalne to uznaje się, że jest także ściśle związane z uszkodzeniem naczyń krwionośnych, głównie na skutek zwiększenia przepuszczalności BBB.

Płytki krwi to najmniejsze elementy morfotyczne krwi powstające w szpiku kostnym na drodze dojrzewania i różnicowania komórek macierzystych – megakariocytów. W porównaniu do pozostałych elementów morfotycznych, płytki krwi mają stosunkowo krótką żywotność, ich przeciętna długość życia w organizmie człowieka wynosi od 5 do 9 dni. Płytki krwi są wyłapywane przez makrofagi i niszczone na drodze fagocytozy w śledzionie i wątrobie. Występowanie małych, bezjądrzastych płytek u przedstawicieli wszystkich gromad ssaków wydaje się być cechą przystosowawczą. Małe płytki krwi mogą szybciej formować czop płytkowy, co bezpośrednio związane jest z ich fizjologiczną funkcją nakierowaną na zapobieganie wynaczynieniu krwi. Niestety, większa reaktywność bezjądrzastych płytek krwi niesie znamienne konsekwencje dla starszych osobników, które są przez to bardziej narażone na występowanie incydentów niedokrwienych. Płytki krwi charakteryzują się dużą reaktywnością w odpowiedzi na działanie bodźców środowiskowych, dzięki obecności unikalnego systemu receptorów błonowych. Fizjologiczna funkcja płytek krwi jest zależna od stanu ich pobudzenia przy udziale odpowiednich receptorów, które odgrywają kluczową rolę w transdukcji sygnału w procesie aktywacji płytek. Rola receptorów płytkowych jest kluczowa w hemostatycznej aktywności płytek krwi. Adhezja, aktywacja, agregacja płytek krwi oraz oddziaływania międzykomórkowe z leukocytami i komórkami śródbłonna są możliwe właśnie dzięki obecności receptorów powierzchniowych.





Przyczyny nadmiernej aktywacji płytek krwi w MS nie są wyjaśnione. Mogą one wynikać z predyspozycji genetycznych lub powstawać na skutek wtórnego procesu chorobowego związanego z zapalnym uszkodzeniem warstwy śródbłonna naczyniowego, gdzie dochodzi do wzajemnej aktywacji płytek krwi, komórek odpornościowych oraz komórek śródbłonna. Badania epidemiologiczne potwierdzają zaburzenia hemostazy naczyniowej wskazując na zwiększone ryzyko występowania incydentów niedokrwienych związanych z patologiczną aktywnością pro-zakrzepową płytek krwi u pacjentów z MS, szczególnie w fazie progresywnej PMS. Udział płytek w patogenezie MS obejmuje ich interakcje z leukocytami oraz komórkami śródbłonna, prowadzące do naruszenia BBB i infiltracji limfocytów do miejsc tworzenia się ognisk demielinizacji w OUN. Istnieje stosunkowo niewiele badań dotyczących czynności płytek krwi w MS. Jednakże dostępne dane literaturowe potwierdzają nadmierną aktywację wewnątrznaczyniową płytek krwi oraz ich nadreaktywność w odpowiedzi na działanie agonistów. Poza wzmożoną funkcją hemostatyczną w MS, udowodniony został także udział płytek krwi w promowaniu procesów neurozapalnych. Przewlekły stan zapalny i wysoka aktywność procesów pro-oksydacyjnych to główne czynniki wskazywane dotychczas jako potencjalna przyczyna nadmiernej aktywności płytek w MS. W odniesieniu do dostępnych danych literaturowych głównym celem niniejszej pracy stało się poznanie molekularnych mechanizmów leżących u podstaw funkcjonowania płytek krwi w MS, co może przyczynić się do zdefiniowania nowych celów terapii skierowanej na te komórki stanowiące istotny element patogenezy MS.

Wśród celów szczegółowych mgr Angela Dziejczak wyróżniła ocenę stanu czynnościowego płytek krwi poprzez określenie stopnia aktywacji płytek krwi w krwi pełnej metodą cytometrii przepływową, pomiar stężenia receptorów P2Y<sub>12</sub>, PAR-1 oraz GPIIb/IIIa w płytkach krwi i megakariocytach metodą ELISA, pomiar ekspresji mRNA dla genów kodujących P2Y<sub>12</sub>, PAR-1 oraz GPIIb/IIIa w płytkach krwi i megakariocytach techniką qPCR, cytometryczne oznaczenie stopnia reaktywności płytkowego receptora P2Y<sub>12</sub>, poprzez pomiar fosforylacji białek VASP, pomiar ekspresji mRNA dla genów kodujących biomarkery miażdżycy w płytkach krwi i megakariocytach techniką qPCR oraz określenie korelacji ekspresji (na poziomie mRNA oraz białka) płytkowego receptora PAR-1 z poziomem biomarkerów miażdżycy (ekspresja mRNA dla genów kodujących ApoA1 (APOA1) oraz  $\alpha$ 2M (A2M)).



Wykonano również kompleksową analizę fibrynogenu w płytkach krwi i megakariocytach poprzez pomiar stężenia fibrynogenu w płytkach krwi, megakariocytach oraz w osoczu metodą ELISA, oznaczenie poziomu mRNA dla genów kodujących łańcuchy ( $\alpha$ -,  $\beta$ - oraz  $\gamma$ -) fibrynogenu w płytkach krwi i megakariocytach, identyfikację potencjalnych PTMs łańcuchów ( $\alpha$ -,  $\beta$ - oraz  $\gamma$ -) fibrynogenu w płytkach krwi i megakariocytach przy zastosowaniu techniki LC-MS-MS/MS (chromatografia cieczowa z tandemową spektrometrią mas) oraz analizę zmian sekwencji genów kodujących łańcuchy ( $\alpha$ -,  $\beta$ - oraz  $\gamma$ -) fibrynogenu.

Doktorantka mgr Angela Dziejczak dokonała także oceny molekularnych zmian  $\beta$ -tubuliny i  $\beta$ -aktyny, jako kluczowych białek cytoszkieletu płytek krwi i megakariocytów poprzez pomiar stężenia  $\beta$ -tubuliny i  $\beta$ -aktyny w płytkach krwi i megakariocytach metodą ELISA, pomiar ekspresji mRNA dla genów kodujących  $\beta$ -tubulinę oraz  $\beta$ -aktynę w płytkach krwi i megakariocytach metodą qPCR, identyfikację potencjalnych PTMs  $\beta$ -tubuliny i  $\beta$ -aktyny w płytkach krwi i megakariocytach przy zastosowaniu techniki LC-MS-MS/MS oraz analizę zmian sekwencji genu kodującego  $\beta$ -tubulinę, ocenę profilu ekspresji miRNA w płytkach krwi i megakariocytach poprzez ilościową analizę metodą mikromacierzy i ilościową walidację wyników metodą qPCR, a także ocenę funkcjonalności mitochondriów w płytkach krwi poprzez zbadanie potencjału błony mitochondrialnej płytek krwi z zastosowaniem sondy JC-1, pomiar ekspresji mRNA dla genów kodujących wybrane enzymy metabolizmu tlenowego w płytkach krwi metodą qPCR i oznaczenie poziomu RFT w płytkach krwi z zastosowaniem sondy H2DCF-DA.

Materiał badawczy wykorzystany w pracy stanowiła świeża krew pełna pochodząca od pacjentów ze stwierdzoną postępującą postacią stwardnienia rozsianego (PMS). Do badań włączono 50 pacjentów z PMS w wieku ( $52,3 \pm 10,4$ ), którzy byli rehabilitowani na Oddziale Rehabilitacji Neurologicznej Miejskiego Centrum Medycznego im. Karola Jonschera, znajdującego się przy ul. Milionowej 14 w Łodzi. Wszyscy pacjenci poddani zostali diagnostyce neuroobrazowej – badaniu rezonansem magnetycznym (ang. *Magnetic Resonance Imaging*, MRI), w celu zobrazowania obecnych zmian demielinizacyjnych, ich charakteru i lokalizacji w różnych obszarach mózgu i rdzenia kręgowego. U każdego pacjenta oceniono stopień niepełnosprawności na podstawie rozszerzonej skali niewydolności ruchowej Kurtzkego (ang. *Expanded Disability Status Scale*, EDSS) oraz przeprowadzono wywiad, na podstawie którego oszacowano poziom depresji według skali depresji Becka (ang. *Beck Depression Inventory*, BDI). Grupę kontrolną stanowiło 50 ochotników bez przewlekłych i/lub ostrych stanów zapalnych, u których nie stwierdzono żadnych





zaburzeń ze strony OUN oraz układu sercowo-naczyniowego. Zdrowi dawcy stanowili grupę homogeną względem płci (60% kobiet) oraz wieku ( $49 \pm 11,2$  lat) z grupą badaną.

W ocenie merytorycznej realizacji zmierzonych celów pracy należy podkreślić wysmieniecie zaplanowany oraz przemyślnych proces badawczy, który pozwolił na kompleksowe badanie molekularnych mechanizmów aktywności pro-zakrzepowej płytek krwi w stwardnieniu rozsianym. Przeprowadzone badania są wynikiem bezpośredniej współpracy Doktorantki z promotorem pracy Panią prof. dr hab. Joanną Saluk-Bijak i odzwierciedlają wysmieniony poziom naukowy kierowanej przez Panią Profesor jednostki naukowej Katedry Biochemii Ogólnej Instytutu Biochemii Uniwersytetu Łódzkiego, tym bardziej że temat pracy jest interesujący ale bardzo wymagający. Stwardnienie rozsiane to bowiem, przewlekła choroba ośrodkowego układu nerwowego osób rasy Kaukaskiej, żyjących głównie w klimacie umiarkowanym, która dotknęła ponad 2 mln ludzi na całym świecie. Polska populacja należy do obszaru wysokiej częstotliwości występowania stwardnienia rozsianego. Szacuje się, że częstość występowania MS w Polsce wynosi od 45 do 92 na 100 000 mieszkańców, a każdego roku odnotowuje się około 2000 nowych przypadków. Pomimo wielu badań, etiologia MS nie jest w pełni poznana. Otrzymane przez Doktorantkę autorskie wyniki są nowatorskie i potwierdzają, że płytki krwi pacjentów z MS charakteryzujące się wysokim poziomem RFT, wskazują na zaburzenia funkcjonowania mitochondriów. W następstwie, przewlekłe bodźce neurozapalne w przebiegu MS zakłócają homeostazę neuroaksonalną, prowadząc do jednoczesnego wzrostu stresu oksydacyjnego, charakteryzującego się wtórnym uszkodzeniem mitochondriów, co finalnie prowadzi do aktywacji mechanizmów pro-apoptotycznych.

Ze szczególnym podkreśleniem należy stwierdzić, że realizacja pracy doktorskiej doprowadziła do kluczowych i przełomowych wniosków końcowych dla diagnostyki, a w przyszłości również leczenia pacjentów z SM:

- Płytki krwi oraz megakariocyty pochodzące z krążenia pacjentów z PMS charakteryzują się wzmożoną ekspresją i reaktywnością wybranych receptorów powierzchniowych dla kluczowych fizjologicznych agonistów płytkowych, co może stanowić przyczynę pro-zakrzepowego potencjału tych komórek, obserwowanego w PMS.
- Zwiększone wewnątrzkomórkowe stężenie fibrynogenu w płytkach krwi i megakariocytach w PMS, zmiany w profilu PTMs, które istotnie różnicują łańcuchy fibrynogenu pomiędzy grupą kontrolną i PMS oraz wykryte zmiany sekwencji DNA: w genie FGA mutacja c.1040A>G



i polimorfizm c.991A>G (rs6050), a w genie FGB mutacja c.832+57T>A mogą przyczyniać się do pro-zakrzepowego charakteru zmian całkowitego potencjału hemostatycznego w PMS, mającego konsekwencje w postaci wysokiego ryzyka występowania zakrzepicy żyłnej i tętniczej.

- Zmiany molekularne  $\beta$ -tubuliny na poziomie białka, mRNA oraz sekwencji DNA mogą stanowić bezpośrednią przyczynę zmienionej odpowiedzi hemostatycznej płytek krwi w PMS.
- Analiza profilu ekspresji miRNA w płytkach krwi i megakariocytach wykazuje w PMS zmiany w poziomie ekspresji cząsteczek: miR-15b-5p, miR-24-3p, miR-126-5p, miR-199a-3p zaangażowanych w regulację procesów aktywacji płytek (w tym w agregację, degranulację, adhezję), a także w proces apoptozy tych komórek.
- Wysokie stężenie wewnątrzkomórkowe RFT, nadmierna depolaryzacja błony mitochondrialnej oraz nadekspresja mRNA dla genów kodujących enzymy metabolizmu tlenowego, które wykazano w płytkach krwi pochodzących od pacjentów z PMS, wskazują na często występującą w chorobach neurodegeneracyjnych dysfunkcję mitochondriów, i co za tym idzie, udział stresu oksydacyjnego w promowaniu pro-zakrzepowej odpowiedzi płytek krwi.

W odniesieniu do dyskusji otrzymanych wyników chciałbym zwrócić uwagę na potencjalną rolę szlaku aktywacji neutrofilów, które odgrywają kluczową rolę w ostrym zapaleniu, a ich udział w przewlekłych chorobach zapalnych i autoimmunologicznych, m.in. w MS jest przedmiotem trwających badań. Zmiany aktywności wybranych receptorów mogą powodować wzrost/spadek ilości neutrofilów, co w konsekwencji może być ściśle związane z przebiegiem choroby. Wiele dowodów wskazuje na udział neutrofilów w rozwoju MS. Opisano zwiększenie aktywności m.in. takich receptorów jak TLR2, CXCR1 u pacjentów z MS w porównaniu do osób potencjalnie zdrowych. Zaobserwowano także zwiększoną odpowiedź receptorów FPR na czynnik chemotaksji fMLP, z czego m.in. wynika nasilenie migracji neutrofilów u pacjentów z MS.

Rodzina receptorów peptydów formylowych, FPR1, FPR2 i FPR3, to receptory sprzężone z białkiem Gi. FPR biorą udział w indukcji stanu zapalnego, wiążą czynnik chemotaksji fMLP, który jest N-formylowanym tripeptydem, silnym czynnikiem chemotaktycznym neutrofilów, a także jest aktywatorem makrofagów. Wiązanie fMLP z receptorem stymuluje wewnątrzkomórkową mobilizację  $Ca^{2+}$  i uwalnianie anionów ponadtlenkowych. W odpowiedzi tej





UNIWERSYTET  
MEDYCZNY  
W ŁODZI



pośredniczy białko G, które aktywuje system wtórnego przekaźnika fosfatydyloinozytol- $\text{Ca}^{2+}$  oraz pośredniczy w chemotaksji makrofagów promując fagocytozę i zwiększenie uwalniania RFT.

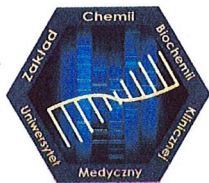
Bardzo proszę Doktorantkę, w odniesieniu do mechanizmu indukcji RFT, jako rozszerzenie podsumowania merytorycznego zawartego we wnioskach końcowych pracy doktorskiej, o omówienie potencjalnej roli neutrofilów w patogenezie SM.

Podsumowując ocenę rozprawy doktorskiej Pani mgr Angeli Dziedzic, należy ze szczególnym uwzględnieniem podkreślić wartościowy pod względem badań podstawowych, ale przede wszystkim możliwości wykorzystania wyników w praktyce klinicznej temat pracy, który odzwierciedla bardzo wysoką aktywność oraz dojrzałość zawodową Doktorantki. Potwierdzeniem tego sukcesu są oryginalne wyniki uzyskane podczas realizacji pracy doktorskiej, które wyznaczają pionierskie kierunki badań związane z molekularnymi mechanizmami wzmożonej aktywności pro-zakrzepowej płytek krwi w stwardnieniu rozsianym. W pracy jednoznacznie potwierdzono fakt, że płytki krwi od pacjentów z PMS wykazują zwiększoną aktywność, jak również wzmożoną ekspresję kluczowych receptorów powierzchniowych i nasiloną odpowiedź na działanie fizjologicznych agonistów płytkowych. Wykazano, że płytki krwi oraz megakariocyty pochodzące od pacjentów z PMS posiadają zwiększone stężenie fibrynogenu, jak również charakteryzują się odmiennym profilem PTMs łańcuchów  $\alpha$ -,  $\beta$ - oraz  $\gamma$ -fibrynogenu oraz zmianami w sekwencjach genów FGA, FGB i FGG, które w sposób istotny różnicują badane grupy. W pracy wykazano także istotne zmiany dotyczące białek cytoszkieletu, odnoszące się przede wszystkim do  $\beta$ -tubuliny, które manifestują się zwiększonym stężeniem wewnątrzkomórkowym tego białka oraz wzrostem liczby transkryptów mRNA zarówno 168 w płytkach krwi, jak i w megakariocytach w PMS. Wykryto również zmiany w sekwencji genu TUBB1 kodującego  $\beta$ -tubulinę. Uzyskane wyniki mogą stanowić częściowe wyjaśnienie potencjalnych mechanizmów molekularnych odpowiedzialnych za zwiększony potencjał pro-zakrzepowy płytek krwi, przyczyniający się do obserwowanego w PMS wzrostu ryzyka występowania incydentów sercowo-naczyniowych

Dlatego, chciałbym podkreślić, że dysertacja mgr Angeli Dziedzic stanowi przykład doskonałego modelu współpracy Pani Prof. dr hab. Joanny Saluk-Bijak oraz Doktorantki, która korzystając z wieloletniego doświadczenia oraz bogatego warsztatu naukowego swojego Promotora osiągnęła wymierne efekty, które z całą pewnością określić można miarą sukcesu.



UNIwersytet  
MEDYCZNY  
W ŁODZI



W podsumowaniu stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny 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.). Z przyjemnością przedkładam do Komisji Uniwersytetu Łódzkiego ds. Stopni Naukowych w dyscyplinie nauki biologiczne, wniosek o dopuszczenie Pani mgr Angeli Dziedzie do dalszych etapów przewodu doktorskiego oraz ze względu na wysoki poziom naukowy tej dysertacji, wnioskuję o wyróżnienie recenzowanej pracy doktorskiej.

Z poważaniem,

KIEROWNIK

Katedry Chemii i Biochemii Medycznej  
Wydział Lekarski Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

*I. Majsterek*  
prof. dr hab. n. med. Ireneusz Majsterek