

AUTOREFERAT

Anna Michno

Gdański Uniwersytet Medyczny

Gdańsk, 2022

1. Imię i nazwisko

Anna Michno

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe lub artystyczne – z podaniem podmiotu nadającego stopień, roku ich uzyskania oraz tytuł rozprawy doktorskiej

25.06.2001 - tytuł magistra farmacji, Kierunek Analityka Kliniczna, Wydział Farmaceutyczny, Akademia Medyczna w Gdańsku.

Tytuł pracy: Malonyl-dialdehyd jako wskaźnik zwiększonej aktywności płytek krwi w cukrzycy;

2002– 2007 - studia doktoranckie, Wydział Lekarski, Katedra Biochemii Klinicznej, Zakład Medycyny Laboratoryjnej, Akademia Medyczna w Gdańsku;

24.04.2007 - tytuł doktora nauk medycznych, Wydział Lekarski, Katedra Biochemii Klinicznej, Zakład Medycyny Laboratoryjnej, Akademia Medyczna w Gdańsku;

Rozprawa doktorska: Wpływ cukrzycy na różne drogi metabolizmu acetylo-CoA i funkcję krwinek płytkowych.

3. Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych lub artystycznych

Od Lipca 2011 - Adiunkt w Zakładzie Medycyny Laboratoryjnej, Katedry Biochemii Klinicznej, Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, Gdańsk;

Luty 2009-czerwiec 2011 Asystent naukowy-Postdoctoral Research Scientist, Szkoła Medyczna w Hull-York, Hull University, Hull, UK;

Lipiec 2007 - styczeń 2009 Asystent naukowy-Postdoctoral Research Scientist, Uniwersytet w Bradford, Wielka Brytania, Biomedical Science, Bradford University Bradford, UK;

2003-2011 Asystent w Zakładzie Medycyny Laboratoryjnej, Katedry Biochemii Klinicznej, Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, Gdańsk;

4. Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt 2 Ustawy

Tytuł osiągnięcia:

Ocena stanu aktywacji płytek krwi jako użyteczny marker w medycynie regeneracyjnej i ocenie ryzyka powikłań hemostatycznych.

4.1 Wprowadzenie

Płytki krwi odgrywają kluczową rolę w procesach hemostazy pierwotnej i w tworzeniu skrzepu. Najważniejszą funkcją płytek krwi jest wygenerowanie mechanicznego czopu, który uniemożliwia swobodny wypływ krwi z uszkodzonego naczynia krwionośnego. Rekrutacja płytek krwi w miejscu uszkodzonej ściany naczyniowej zachodzi dzięki wiązaniu glikoproteiny (GP) IIb/IIIa, Ib-IX-V z czynnikiem von Willebranda (VWB) oraz GP VI i integryny $\alpha_1\beta_2$ z kolagenem i innymi składnikami macierzy podśróbłonkowej. W konsekwencji dochodzi do aktywacji płytek krwi: zmiany ich kształtu, uwolnienia do przestrzeni pozapłytkowej licznych substancji zgromadzonych w ziarnistościach α i δ takich jak ADP, ATP, jony wapnia i magnezu, serotonina, fibrynogen, fibronektyna, czynnik płytkowy 4 (PF4), czynnik von Willebranda, trombospondyna, płytkopochodny czynnik wzrostu (PDGF), białko S, czynnik V czy czynnik VIII. Substancje te intensyfikują aktywację płytek krwi. Na powierzchni błon komórkowych aktywowanych płytek zwiększa się ilość ujemnie naładowanych fosfolipidów. Stanowią one podłoże strukturalne dla reakcji osoczowych czynników krzepnięcia, co umożliwia wytworzenie sieci przestrzennej fibryny i stabilizację skrzepu pod wpływem wygenerowanej trombiny. Nagromadzona trombina również powoduje dalszą aktywację płytek krwi, poprzez intensyfikację uwalniania ziarnistości płytkowych. Prowadzi to do syntezy związków lipidowych takich jak tromboksan A_2 (TXA₂) czy czynnik aktywujący płytki (PAF), do agregacji płytek, a w konsekwencji do wytworzenia stabilnego czopu płytkowego.

Niezależnie od istotnej roli w procesach hemostazy i tworzenia skrzepu, płytki krwi są również komórkami biorącymi udział w procesach stanu zapalnego. Aktywowane płytki krwi wydzielają z ziarnistości szereg czynników sygnalizacyjnych charakterystycznych dla komórek układu odpornościowego takich jak: cytokiny, czynniki wzrostu, peptydy przeciwbakteryjne, aminy biogenne (Coppinger i wsp. 2004, Versteeg i wsp. 2013).

W warunkach fizjologicznych aktywacja płytek krwi w wyniku uszkodzenia śródbłonka naczyniowego zapewnia sprawne hamowanie krwawienia, uszczelnienie łożyska naczyniowego, przy jednoczesnym utrzymaniu płynności krążącej krwi. Upośledzona

aktywacja płytek krwi może być przyczyną skazy krwotocznej. Natomiast, nadmierna aktywacja płytek krwi może zwiększać podatność pacjentów na incydenty zakrzepowe.

Istnieje wiele czynników środowiskowych lub genetycznych, które mogą być przyczyną zwiększonej aktywacji płytek krwi takich jak hiperglikemia w cukrzycy, hipercholesterolemia, podeszły wiek, stosowanie używek, zaburzenia hormonalne, choroby nowotworowe czy autoimmunologiczne. Co więcej, nadreaktywność płytek krwi może być czynnikiem sprawczym zdarzeń niedokrwiennych u pacjentów z chorobami kardiologicznymi, a szczególnie w grupie pacjentów z wszczepionymi stentami. Dlatego też, w grupie pacjentów, u których domniemanym czynnikiem sprawczym powikłań zakrzepowo-zatorowych jest nadmierna reaktywność płytek krwi stosuje się leki hamujące ich aktywność. Należą do nich tzw. leki przeciwplatekcyjne z grupy inhibitorów cyklooksygenazy (kwas acetylosalicylowy), antagonistów receptora purynergicznego P₂Y₁₂ (w tym klopidogrelu, prasugrelu, jak również tikagrelor) czy antagonistów (GP) IIb/IIIa (Abcycsymab, Eptyfibatyd, Tirofiban, Lamifiban) (Ghosal i wsp. 2014, Puurunen i wsp. 2018).

Nowoczesne techniki stosowane u pacjentów w ortopedii umożliwiają rekonstrukcję stawu biodrowego, segmentów kręgosłupa, stawu kolanowego, przy użyciu implantów. Zazwyczaj są to różnego rodzaju śruby, gwoździe, wkręty, płytki, klatki, fragmenty kości wytwarzane z metali, cementów i różnego typu twardych lub elastycznych polimerów. Podobnie w chirurgii naczyniowej czy kardiochirurgii stosuje się syntetyczne stenty naczyniowe. Implanty są to wszelkie materiały medyczne wykonane z biomateriałów, które po umieszczeniu wewnątrz organizmu mogą pozostawać w nim przez dłuższy czas dzięki bio-kompatybilności. Łączą one żywą tkankę trwale lub mogą brać udział w regeneracji tkanek pacjenta.

W przypadku kontaktu krwi z biomateriałem istnieje ryzyko, rekrutacji płytek krwi na jego powierzchni czy uwalniania przez biomateriał czynników egzogennych modyfikujących aktywację płytek krwi, co może prowadzić do powikłań zakrzepowych lub zwiększać ryzyko krwawienia pooperacyjnego (Cenni i wsp. 2002, Matus i wsp. 2018).

Uzasadnia to prowadzenie badań dotyczących aktywności płytek krwi w zetknięciu z materiałami używanymi w implantologii ortopedycznej lub sercowo-naczyniowej.

Terapia autologicznym osoczem bogatopłytkowym (PRP) podawanym miejscowo to nowatorska metoda stosowana w medycynie regeneracyjnej, a szczególnie w dermatologii, okulistyce, stomatologii, chirurgii czy w leczeniu uszkodzeń i zwyrodnień narządu ruchu (Akedo i wsp. 2019, Moraes i wsp. 2013). Osoczowe preparaty zawierające skoncentrowane płytki krwi (osocze bogatopłytkowe) mogą być aktywowane endogennym kolagenem lub poprzez dodanie trombiny albo chlorku wapnia do iniekcji. Tak aktywowane płytki krwi

uwalniają z ziarnistości α czynniki wzrostu takie jak: insulinopodobny czynnik wzrostu (insulin-like growth factor 1 – IGF-1), czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego (vascular-endothelial growth factor – VEGF), transformujący czynnik wzrostu (transforming growth factor β – TGF- β), czynnik wzrostu fibroblastów (fibroblast growth factor – FGF), płytkowy czynnik wzrostu (platelet-derived growth factor – PDGF), hepatocytowy czynnik wzrostu (hepatocyte growth factor – HGF) i naskórkowy czynnik wzrostu (epidermal growth factor – EGF). Tak więc, płytki krwi w PRP są źródłem czynników wzrostu wpływając na angiogenezę, chemotaksję, proliferację i różnicowanie komórkowe, oddziałują na procesy regeneracji tkankowej, w tym w leczeniu trudno gojących się ran czy zmian zwyrodnieniowych stawów lub kręgosłupa (Cavallo i wsp. 2016, Dhurat i wsp. 2014). Niestety, znacząca część dostępnych danych w literaturze dotyczących efektywności stosowania PRP nie pozwala na jednoznaczne potwierdzenie skuteczności miejscowego stosowania skoncentrowanych płytek krwi w regeneracji tkanek czy leczenia bólu ze względu na brak danych potwierdzających aktywację płytek krwi i wydzielanie czynników wzrostowych w miejscu podania PRP. Co więcej, analiza metod stosowanych w większości badań klinicznych z użyciem PRP może wskazywać na to, że płytki krwi nie są aktywowane lub aktywacja jest podprogowa, a więc niewystarczająca do wydzielenia płytkowych czynników wzrostu do środowiska zewnątrzkomórkowego.

Dlatego opracowanie bezpiecznej i skutecznej metody aktywacji płytek *in situ* i kontroli jej skuteczności mogłoby mieć istotne znaczenie dla tej metody leczenia.

Szereg danych klinicznych wskazuje na hiperaktywność krwinek płytkowych u pacjentów z cukrzycą. U pacjentów z hiperglikemią obserwowano wzrost zarówno spontanicznej, jak i indukowanej agonistami agregacji płytek krwi, która była skorelowana z poziomem glikemii we krwi. W krążeniu pacjentów z hiperglikemią nasila się kurczliwość cytoszkieletu płytek krwi, wzrasta stężenie płytkowych markerów aktywacji, w tym ATP/ADP, tromboksanu A₂ (TXA₂), β -tromboglobuliny (β -TG) czy czynnika płytkowego 4 (PF4) i w konsekwencji wzrasta liczba agregatów płytkowych. Stan przewlekłej hiperglikemii może przyspieszać trombopoezę, prowadzącą do powstania płytek krwi o zwiększonej objętości w wyniku nadmiernego magazynowania ziarnistości w megakariocytach i deformacji błon płytkowych, a w konsekwencji do nadmiernej degranulacji płytek krwi w cukrzycy Blache i wsp. 2015, Kakouros i wsp. 2011, Michno i wsp. 2007).

Procesy nieenzymatycznej glikacji płytek krwi w hiperglikemii mogą nasilać ekspresję płytkowych receptorów aktywacji, zaburzać homeostazę jonów Ca²⁺ w odpowiedzi na trombinę. Zwiększona ekspresja receptorów P2Y₁₂ w hiperglikemii prowadzi do spadku

poziomu wewnątrzpłytkowego cAMP, powodując nadmierną reaktywność płytek krwi (Thaning i wsp. 2010, Xia i wsp. 2015).

Towarzysząca cukrzycy hiperglikemia może być czynnikiem nadmiernej aktywacji płytek krwi prowadzącym do występowania powikłań zakrzepowych u pacjentów. Dlatego też, monitorowanie funkcji płytek krwi i określenie mechanizmu nadmiernej aktywacji płytek krwi u pacjentów z cukrzycą w hiperglikemii może mieć potencjalnie korzystny efekt w zapobieganiu incydentom zakrzepowo-zatorowym.

Istnieje szereg czynników zarówno endogennych, jak i egzogennych, które modyfikują metabolizm, aktywację i funkcje płytek krwi. Rozwój biochemii klinicznej i technik terapeutycznych prowadzi do poznania coraz to nowych sytuacji klinicznych, w których może dochodzić do aktywacji lub hamowania funkcji płytek krwi, prowadzących do zaburzeń hemostazy lub umożliwiających zastosowanie płytek krwi w regeneracji komórek lub tkanek. Dlatego ocena aktywacji i funkcji płytek krwi jest istotna, ze względu na niebezpieczeństwo powikłań zakrzepowych albo wystąpienia nabytych płytkowych skaz krwotocznych w różnych stanach patologicznych jak i podczas ich leczenia oraz na potencjalnie korzystne wykorzystanie preparatów płytek krwi w medycynie regeneracyjnej.

4.2 Cel przeprowadzonych badań

Celem podjętych badań było wykazanie, że metabolizm i aktywacja płytek krwi może ulegać modyfikacji w wyniku ekspozycji na wybrane kliniczne czynniki egzogenne i endogenne i, że może to mieć istotne znaczenie dla oszacowania niebezpieczeństwa powikłań hemostatycznych u pacjentów oraz użyteczności preparatów płytek krwi w medycynie regeneracyjnej.

W tym celu dokonano oceny:

1. wpływu neuromodulacji pulsacyjnej (PRF) na aktywację płytek krwi i uwalnianie ziarnistości płytkowych w celu potwierdzenia skuteczności terapii (praca 2 cyklu);
2. wpływu hiperglikemii na metabolizm energetyczny i funkcje płytek krwi w cukrzycy oraz ocena wpływu inhibitora dehydrogenazy pirogronianowej (PDH): 3-bromopirogronianu (3-BrPG) oraz rezweratrolu: polifenolu o właściwościach hipoglikemizujących i antyagregacyjnych) na aktywację i funkcje płytek krwi (praca 3 i 4 cyklu);
3. wpływu modyfikowanych cementów kostnych na agregację i przeżywalność płytek krwi w celu oceny bezpieczeństwa modyfikowanych biomateriałów u pacjentów (praca 1 cyklu);

4. wpływu S-Nitrozoglutathionu (GSNO), który jest stabilną formą tlenu azotu (NO) na zależną do czynnika von Willebranda (VWF) aktywację płytek krwi zarówno w warunkach statycznych, jak i tworzenia skrzepu w warunkach *in vitro* (praca cyklu 5);

4.3 Opis publikacji: opis osiągnięcia naukowego

W skład osiągnięcia naukowego wchodzi cykl pięciu powiązanych tematycznie artykułów naukowych.

1. **Michno A**, Kirkor Z, Gojtowska E, Suchorzewski M, Śmietańska I, Baścik B. 2021, Pulsed Radiofrequency Neuromodulation Contributes to Activation of Platelet-Rich Plasma in In Vitro Conditions. *Neuromodulation*; 2021 Dec; 24(8): 1451-1457. IF = 4,722, punktacja MNiSW =100,0;

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: współprzygotowaniu hipotezy projektu dotyczącego wpływu pulsacyjnej radiofrekwencji na metabolizm i aktywację płytek krwi w osoczu bogatopłytkowym, opracowaniu schematu doświadczeń i wykonaniu oznaczenia czynnika płytkowego 4, ATP; analizie statystycznej wyników, przygotowaniu i napisaniu manuskryptu, autor korespondencyjny;

Celem badania była weryfikacja hipotezy, że połączenie obu technik leczenia bólu: wstrzyknięć preparatów osocza bogatopłytkowego (PRP) z równoczesnym zastosowaniem pulsacyjnej radiofrekwencji (PRF) może nasilać metabolizm, aktywację płytek krwi i uwalnianie czynników wzrostu bezpośrednio w miejscu podania a przez to przyspieszać regenerację tkanek i wpływać na odczucie bólu. Połączenie obu technik leczenia, prowadzące do nasilenia aktywacji płytek krwi mogłoby mieć potencjalne korzystne działanie w medycynie regeneracyjnej.

Założenia pracy:

Jedną z nowszych metod leczenia dolegliwości bólowych stawów i zwyrodnienia kręgosłupa jest wstrzykiwanie autologicznego osocza bogatopłytkowego (ang. Platelet Rich Plasma, skrót: PRP). Koncentrat PRP lub lizaty płytkowe są uznawane za bogate źródło czynników wzrostu i innych cytokin, które pochodzą z ziarnistości alfa aktywowanych płytek krwi i mogą odgrywać

istotną rolę w przyśpieszeniu gojenia tkanki miękkiej, regeneracji i leczeniu bólu (Anitua i wsp. 2005, Akeda i wsp. 2019). Jednakże, w większości przypadków stosowane koncentraty PRP przed podaniem pacjentom nie są aktywowane lub są aktywowane przed podaniem trombiną lub chlorkiem wapnia (Cavallo i wsp. 2016, Huber i wsp. 2016). Dlatego też, nie wiadomo, w jakim stopniu i czy skutecznie płytki krwi znajdujące się w takich preparatach uwalniają czynniki wzrostowe.

Neuromodulacja pulsacyjna, Pulsacyjna Radiofrekwencja (ang. Pulsed radiofrequency, skrót: PRF) jest małoinwazyjną techniką terapeutyczną stosowaną w leczeniu bólu bez trwałego uszkodzenia tkanek. Szereg randomizowanych badań klinicznych wykazało skuteczność PRF w leczeniu bólu pochodzącego m. in. z korzenia nerwowego, nerwów obwodowych, krążka międzykręgowego (Koh i wsp. 2015, Schianchi i wsp. 2013). Mechanizm działania PRF nie jest jednoznacznie wyjaśniony. Jednym z postulowanych mechanizmów działania PRF jest wywoływanie reakcji zapalnej poprzez aktywację wydzielania czynników wzrostu i cytokin z komórek i tkanek poddawanych neuromodulacji (Van Boxem i wsp. 2014).

Opis uzyskanych wyników:

Osoczowy koncentrat płytek krwi był poddawany przerywanym, szybkim impulsom elektrycznym (500kHz, 5ms/5Hz, przez 120sec, napięcie 40V, z maksymalną temperaturą 42°C) przez 20 min, zapewniając parametry elektryczne identyczne do stosowanych u pacjentów w miejscowym leczeniu zespołów korzeniowych lub bólu stawu. W przedstawionej pracy wykazano, że ekspozycja koncentratów płytek krwi na Pulsacyjną Radiofrekwencję (PRF) powodowała aktywację płytek krwi (Ryc. 1). Aktywacja płytek krwi była oceniana na podstawie ilości płytkowego czynnika 4 (PF4) wydzielanego z ziarnistości α oraz ATP jako markera uwalnianego z ziarnistości gęstych (Ryc. 1). Ilość wydzielonego PF4 i ATP była dwukrotnie wyższa w porównaniu do płytek krwi, które nie były eksponowane na PRF. Co może świadczyć o tym, że impulsy elektryczne stosowane w technice PRF mogą aktywować płytki krwi do wydzielania zarówno ziarnistości α , jak i gęstych. Tak więc, płytki krwi eksponowane na PRF mogą stanowić lokalnie źródło czynników wzrostowych do regeneracji tkanek. Tym samym, PRF mógłby być czynnikiem aktywującym płytki krwi. Fakt, że ilość PF4 i ATP wydzielona z płytek eksponowanych na PRF do przestrzeni pozakomórkowej była podobna do ilości tych markerów w płytkach krwi aktywowanych trombiną, która jest silnym agonistą płytek krwi, może świadczyć o tym, że PRF w zastosowanych parametrach posiada zdolność aktywacji płytek krwi, porównywalną do najsilniejszych agonistów płytkowych (Ryc. 1). Dodatkowo, łączne zastosowanie PRF i trombiny indukowało wydzielanie PF4 do wartości

obserwowanych przy aktywacji płytek jedynie PRF lub trombiną. Jednocześnie ilość wydzielonego ATP przy łącznym zastosowaniu PRF i trombiny była porównywalna do ilości w osoczu kontrolnym. Dane te mogą wskazywać na to, że łączna aktywacja płytek krwi poprzez PRF i trombinę nie ma żadnych dodatkowych korzyści. Tak więc PRF mógłby być stosowany do aktywacji płytek krwi bez potrzeby stosowania egzogennych agonistów, takich jak trombina czy kolagen. Zarówno PRF, jak i temperatura 42°C, która może lokalnie i krótkoczasowo wystąpić pod wpływem pulsacyjnej neuromodulacji, nie miały wpływu na aktywację i agregację płytek krwi. PRF nie zmieniało metabolizmu energetycznego mierzonego aktywnością dehydrogenazy bursztynianowej w teście MTT, ani też nie powodowało uszkodzenia płytek krwi w teście uwalniania LDH do przestrzeni pozakomórkowej. Tak więc, metoda PRF nie miała wpływu na metabolizm i przeżywalność płytek krwi. Prawdopodobnym mechanizmem aktywacji płytek krwi przez PRF mogłaby być permabilizacja błon płytkowych prowadząca do aktywacji płytek krwi, zależnej od mobilizacji jonów wapnia.

Dane te wskazują, że PRF mogą powodować aktywację płytek krwi. Uzasadniałoby to stosowanie miejscowe preparatów PRP czy lizatów płytkowych w medycynie regeneracyjnej w ortopedii, stomatologii, chirurgii czy dermatologii.

Wyniki przeprowadzonych badań wskazują, że metoda aktywacji płytek przy użyciu PRF daje podobne efekty jak te osiągnięte przy zastosowaniu najsilniejszych agonistów aktywacji płytek. Tak więc, użycie PRF łącznie z miejscowym podaniem preparatów PRP czy lizatów płytkowych w medycynie regeneracyjnej umożliwiłoby pełną aktywację płytek krwi i efektywne wydzielanie płytkopochodnych czynników wzrostu bez konieczności stosowania egzogennych aktywatorów płytek krwi. Niezbędna jest jednak ocena wpływu PRF na aktywację płytek krwi w pierwotnych hodowlach fibroblastów czy chondrocytów, w celu wstępnej oceny skuteczności takiej terapii przed zastosowaniem u pacjentów ortopedycznych czy dermatologicznych.

Wnioski:

- a) Pulsacyjna Radiofrekwencja (PRF) aktywowała płytki krwi.
- b) Aktywacja płytek krwi przez PRF była związana ze zwiększeniem wydzielania ziarnistości płytkowych.
- c) PRF zwiększała wydzielanie ziarnistości płytkowych w stopniu podobnym do tego jaki obserwuje się po aktywacji trombiną, która jest jednym z najsilniejszych agonistów aktywacji płytek krwi.

d) PRF nie miała wpływu na metabolizm i integralność strukturalną płytek krwi.

2. **Michno A**, Gruzewska K, Bielarczyk H, Zysk M, Szutowicz A. 2020, Inhibition of pyruvate dehydrogenase complex activity by 3-bromopyruvate affects blood platelets responses in type 2 diabetes. *Pharmacol Rep*; 72(1): 225. IF = 3,024, punktacja MNiSW = 100,0;

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: współprzygotowaniu hipotezy projektu dotyczącej wpływu przewlekłej hiperglikemii w cukrzycy na zwiększenie ekspresji podjednostki E2 (transacetylazy dihydrolipoilu) i aktywności dehydrogenazy pirogronianowej PDHc płytek krwi oraz potwierdzeniu, że zmiany metabolizmu płytek krwi prowadzą do hiperaktywacji płytek krwi u pacjentów z cukrzycą typu 2, opracowaniu schematu doświadczeń i wykonaniu oznaczenia agregacji płytek krwi, aktywności PDH, ekspresji podjednostki E2, zawartości ATP, oznaczenia poziomu acetylo-CoA, analizie statystycznej wyników, przygotowaniu i napisaniu manuskryptu, autor korespondencyjny;

Celem przeprowadzonych badań było wykazanie, że przewlekła hiperglikemia w cukrzycy może prowadzić do przyspieszenia metabolizmu płytek krwi poprzez wzrost poziomu i aktywności PDH, i że za hamowanie aktywności PDH przez inhibitor PDH (3-bromopirogronian, 3-BrP) może redukować nadmierną aktywację płytek krwi u pacjentów z cukrzycą typu 2.

Założenia pracy:

Przewlekła hiperglikemia w cukrzycy typu 2 wiąże się z nadmierną aktywacją płytek krwi, zależną m.in. od zwiększonej osmotyczności osocza, zwiększoną objętością płytek krwi, zwiększoną produkcją tromboksanu A₂ (TXA₂), zmniejszoną płynnością błon komórkowych oraz przyspieszeniem metabolizmu energetycznego płytek krwi, co w konsekwencji prowadzi do rozwoju powikłań naczyniowych w postaci mikro- i makroangiopatii (Michno i wsp. 2003 i 2007, Vazzana i wsp. 2012). Jednocześnie płytki krwi u chorych na cukrzycę wykazują zmniejszoną odpowiedź na kwas acetylosalicylowy, co skutkuje niedostateczną ochroną przed powikłaniami o charakterze zakrzepicy naczyń tętniczych (Derun i wsp. 2010). W związku z tym, poznanie mechanizmów aktywacji płytek krwi w warunkach hiperglikemii jest istotne dla opracowania odpowiedniej strategii leczenia przeciwplateletowego w celu zapobiegania niepełnosprawności i przedwczesnej śmierci pacjentów z cukrzycą.

Dane w piśmiennictwie wskazują też, że przewlekła hiperglikemia jest jednym z mechanizmów uogólnionej aktywacji i agregacji płytek krwi i jest skorelowana z poziomem glikemii u pacjentów z cukrzycą (Michno i wsp. 2003, 2006 i 2007, Blache i wsp. 2015, Thaning i wsp. 2010). Glukoza jest podstawowym substratem energetycznym dla płytek krwi. Jest ona transportowana do wnętrza płytek przy udziale transportera glukozy typu 3, który jest niezależny od insuliny Craik i wsp. 2003). Dlatego też, u pacjentów z hiperglikemią obserwuje się adaptacyjne zmiany związane z przyspieszonym transportem i utylizacją glukozy oraz zwiększonym metabolizmem energetycznym w płytkach krwi. Nasze poprzednie badania wykazały, że w płytkach krwi pacjentów z cukrzycą obserwuje się zwiększony poziom i wydzielanie ATP i ADP oraz zależną od PDH przyspieszoną wewnątrzmitochondrialną produkcję i transport acetylo-CoA do przestrzeni cytoplazmatycznej, gdzie może on być substratem do produkcji lipidowych aktywatorów płytek krwi takich jak TXA₂ czy czynnik aktywujący płytki PAF. U pacjentów z cukrzycą obserwowano wzrost aktywności heksokinazy odpowiedzialnej za utylizację glukozy, wzrost aktywności dehydrogenazy pirogronianowej dostarczającej pirogronian do przestrzeni mitochondrialnej, gdzie jest on metabolizowany do acetylo-CoA. W hiperglikemii obserwowano również wzrost aktywności płytkowej liazy ATP-cytrynianowej odpowiedzialnej za pośredni transport acetylo-CoA do przestrzeni cytoplazmatycznej oraz wzrost syntetazy kwasów tłuszczowych, która może dostarczać kwasów tłuszczowych do syntezy lipidowych aktywatorów płytek krwi (Michno i wsp. 2003, 2006 i 2007, Blache i wsp. 2015, Ghosal i wsp. 2014, Guo i wsp. 2009). Dlatego zakładano, że inhibicja zwiększonej aktywności kluczowych enzymów metabolizmu energetycznego, takich jak PDH w płytkach krwi eksponowanych na *in vivo* przewlekłą hiperglikemii w cukrzycy mogłoby hamować nadmierną aktywację płytek krwi u pacjentów z cukrzycą.

Opis uzyskanych wyników:

Badania były przeprowadzone na płytkach krwi izolowanych z krwi 10 zdrowych ochotników i 9 pacjentów z cukrzycą typu 2. Obie grupy były skorelowane wiekowo. Poziomy glukozy i fruktozaminy (glikowana albumina), która odzwierciedla stan glikemii w ostatnich 2 tygodniach przed badaniem były znamienne wyższe odpowiednio o 61% i 64% u pacjentów z cukrzycą, w porównaniu do osób zdrowych. Wskazuje to, że, zarówno megakariocyty jak i powstające z nich płytki krwi były u pacjentów z cukrzycą eksponowane na stan przewlekłej hiperglikemii. W tej pracy wykazano, że agregacja spontaniczna oraz agregacja indukowana trombiną płytek krwi u pacjentów z cukrzycą była wyższa odpowiednio o 67% i 48%, w porównaniu do osób zdrowych (Ryc. 1). Natomiast akumulacja płytkowych reaktywnych

związków reagujących z kwasem tiobarbiturowym (TBARS) w płytkach spoczynkowych, jak i po aktywacji trombiną, która odzwierciedla stopień peroksydacji lipidów oraz pośrednio produkcję TXA₂, była odpowiednio o 60% i 15% wyższa u pacjentów z cukrzycą, w porównaniu do osób zdrowych. Wydzielanie ATP z ziarnistości płytek krwi aktywowanych trombiną było o 47% wyższe u pacjentów z cukrzycą, w porównaniu do osób zdrowych (Ryc. 1). Aktywność PDH oraz poziom białka dla podjednostki E2 PDHC (transacetylazy dihydrolipoilu) był znacząco wyższy w płytkach pacjentów z cukrzycą o odpowiednio 66% i 70%, w porównaniu do osób zdrowych (Ryc. 1). Natomiast ilość białka podjednostek E1 i E3 nie ulegała zmianie. Może to świadczyć o tym, że podjednostka E2 w płytkach pacjentów z cukrzycą podlega regulacji przez fosfatazę PDH (Maj i wsp. 2005). Potwierdza to fakt, że inhibitor PDH (3-bromopirogronian, 3-BrP) hamował aktywność PDH w płytkach pacjentów z cukrzycą silniej niż w płytkach osób zdrowych.

Tak więc, ekspozycja płytek krwi i megakariocytów na przewlekłą hiperglikemię powodowała zwiększenie ekspresji płytkowego białka dla PDHC-transacetylazy dihydrolipoilu (EC 2.3.1.12), przyspieszenie metabolizmu energetycznego i zwiększała aktywację i agregację płytek krwi.

Reasumując, hiperglikemia była czynnikiem aktywującym płytki krwi u pacjentów z cukrzycą poprzez przyspieszenie metabolizmu energetycznego zależnego od transacetylazy dihydrolipoilu PDH. Moje obserwacje dotyczące nadmiernej aktywacji płytek cukrzycowych przez zależną od BrPG inhibicję PDH stanowią pierwsze w literaturze światowej doniesienie na ten temat.

Wnioski:

- a) Zwiększone wydzielanie ATP, produkcja TBARS oraz agregacja płytek krwi pacjentów z cukrzycą świadczą o tym, że hiperglikemia w cukrzycy jest czynnikiem aktywującym płytki krwi i może zwiększać ryzyko powikłań zakrzepowych.
- b) Zwiększona aktywność PDHC w płytkach krwi z cukrzycą, może być związana ze zwiększoną ekspresją podjednostki E2 (transacetylazy dihydrolipoilu) PDHC indukowaną przez ekspozycję płytek krwi i megakariocytów na przewlekłą hiperglikemię.
- c) Selektywna inhibicja PDHC-E2 może być potencjalnie korzystna w zapobieganiu hiperaktywacji płytek krwi w cukrzycy typu 2.

3. **Michno A**, Gruzewska K, Ronowska A, Gul-Hinc S, Zyśk M, Jankowska-Kulawy A. 2022, Resveratrol Inhibits Metabolism and Affects Blood Platelet Function in Type 2 Diabetes. *Nutrients*; 14(8): 1633. IF = 6,706, punktacja MNiSW = 140;

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: przygotowaniu hipotezy projektu dotyczącej wpływu rezweratrolu na metabolizm i funkcje płytek krwi w cukrzycy, opracowaniu schematu doświadczeń i wykonaniu oznaczenia tworzenia skrzepu w warunkach *in vitro*, analizie statystycznej wyników, przygotowaniu i napisaniu manuskryptu, autor korespondencyjny;

Celem przeprowadzonych badań było wykazanie, że rezweratrol może redukować nadmierną aktywność płytek krwi i tworzenie skrzepu u pacjentów z cukrzycą typu 2 poprzez hamowanie płytkowego metabolizmu energetycznego i uwalnianie czynników aktywujących płytki krwi.

Założenia pracy:

Przewlekła hiperglikemia przyczynia się do adaptacyjnych patologicznych modyfikacji metabolizmu i funkcji śródbłonna oraz płytek krwi, które prowadzą do długotrwałych powikłań o charakterze mikro- i makro-angiopatii w przebiegu cukrzycy typu 2. Pomimo różnych schematów leczenia, WHO przewiduje, że cukrzyca będzie siódmą przyczyną śmierci pacjentów w 2030 roku. W związku z tym cukrzyca wymaga dalszych badań skoncentrowanych na znalezieniu nowych alternatyw czy leczenia wspomagającego w celu zapobiegania jej długotrwałym powikłaniom.

Resweratrol (3,5,4'-trihydroksy-trans-stylben) jest rodzajem naturalnego, roślinnego związku polifenolowego. Szereg badań wykazało silne i korzystne działanie tego polifenolu zarówno u zwierząt, jak i ludzi. Wiadomo, że rezweratrol wywiera działanie przeciwutleniające, przeciwzapalne, neuroprotektoryjne, przeciwnowotworowe, rozszerzające naczynia krwionośne, ochronne na chrząstkę stawową, kardioprotektoryjne czy przeciwplateletowe (Galiniak i wsp. 2019). Dane w piśmiennictwie potwierdzają również, że rezweratrol wykazuje właściwości hipoglikemizujące i przeciwzapalne zarówno u zwierząt z indukowaną cukrzycą, jak i u pacjentów. It tak, podawanie rezweratrolu szczurom z cukrzycą, zmniejszyło poziom glukozy w osoczu lub hemoglobiny glikowanej poprzez przyspieszenie wychwyty glukozy przez transportery GLUT4 i zwiększenie wewnątrzkomórkowego transportu glukozy (Huang i wsp. 2020, Gambini i wsp. 2015). Co więcej, suplementacja rezweratrolem zmniejszała produkcję prozapalnego czynnika martwicy nowotworów (TNF- α), interleukiny 1 (IL1b) czy interleukiny 6 (IL-6), zwiększała wrażliwość komórek na insulinę, poprawiała masę i strukturę komórek β

trzustki, czy przywracała funkcję śródbłonna w aortach u zwierząt z indukowaną cukrzycą (Gambini i wsp. 2015, Zhang i wsp. 2009).

Szereg badań potwierdziło też, że resweratrol wywiera działanie plejotropowe u ludzi i może mieć korzystne działanie u pacjentów z cukrzycą (Zhu i wsp. 2017). Ostatnie metaanalizy wykazały, że suplementacja rezweratrolem, zwłaszcza dawkami ≥ 100 mg/d, powodowała redukcję poziomu glukozy w osoczu na czczo i zwiększyła poziom insuliny u pacjentów z cukrzycą typu 2 (Zhu i wsp. 2017). Wiadomo również, że rezweratrol ma działanie przeciwplatekcyjne, zarówno w warunkach *in vitro*, jak i *in vivo* (Marumo i wsp. 2020, Stef i wsp. 2006).

Brak jednak danych na temat wpływu rezweratrolu na tworzenie skrzepu, aktywację i metabolizm płytek krwi w cukrzycy typu 2. Dlatego też w naszych badaniach weryfikowaliśmy hipotezę, że rezweratrol zmniejsza aktywację płytek krwi i tworzenie skrzepu poprzez hamowanie metabolizmu energetycznego i wydzielania płytkowych czynników aktywujących w warunkach hiperglikemii w cukrzycy typu 2.

Opis uzyskanych wyników:

Badania były przeprowadzone na płytkach krwi izolowanych z krwi 8 zdrowych ochotników i 10 pacjentów z cukrzycą typu 2. Obie grupy były skorelowane wiekowo. Poziomy glukozy, hemoglobiny glikowanej i fruktozaminy były znamienne wyższe u pacjentów z cukrzycą, w porównaniu do osób zdrowych. Tak więc, zarówno megakariocyty jak i powstające z nich płytki krwi były u pacjentów z cukrzycą ekspozowane na stan przewlekłej hiperglikemii. W tej pracy wykazano, że agregacja indukowana kolagenem, produkcja TXA_2 , akumulacja TBARS, aktywność heksokinazy i dehydrogenazy glukozy-6-fosforanowej w płytkach krwi u pacjentów z cukrzycą była znamienne wyższa odpowiednio o 17%, 47%, 27%, 32% i 25%, w porównaniu do płytek krwi izolowanych od osób zdrowych (Ryc. 1). Tak więc, przedstawione badania potwierdzają, że ekspozycja płytek krwi na przewlekłą hiperglikemię powodowała przyspieszenie metabolizmu energetycznego i zwiększyła aktywację i agregację płytek krwi.

Zastosowanie trans-rezweratrolu (Res) (0,25mM), który jest polifenolem pochodzenia roślinnego, suplementem diety o znanych właściwościach hipoglikemizujących i przeciwplatekcyjnych, znamienne hamowało tworzenie skrzepu w warunkach przepływu kapilarnego *in vitro* zarówno we krwi osób zdrowych, jak i pacjentów z cukrzycą, odpowiednio o 50% i 60%. Wyniki te potwierdzają, że rezweratrol wykazuje działanie przeciwkrzepliwie. Natomiast, obserwacja, że efekt rezweratrolu był silniejszy we krwi pacjentów z cukrzycą sugeruje jego potencjalne korzystne działanie w zapobieganiu powikłaniom naczyniowym u

pacjentów z hiperglikemią. Równocześnie rezweratrol redukował zależną od kolagenu adhezję i agregację krwinek płytkowych zarówno u osób zdrowych (odpowiednio o 85% i 54%) jak i pacjentów z cukrzycą (odpowiednio o 55% i 52%), co potwierdza, że związek ten hamuje zarówno wczesną, jak i późną fazę aktywacji krwinek płytkowych. Obserwacje te są zgodne z danymi innych badaczy, którzy potwierdzili, że rezweratrol redukował agregację płytek krwi aktywowanych trombiną poprzez hamowanie sygnalizacji komórkowej zależnej od jonów wapnia (Marumo i wsp. 2020). Równocześnie, rezweratrol hamował aktywności heksokinazy, dehydrogenazy glukozy-6-fosforanowej, jak również mitochondrialnej akonitazy i dehydrogenazy izo-cytrynianowej, zarówno w płytkach osób zdrowych (odpowiednio 49%, 50%, 49% i 50%), jak i u pacjentów z cukrzycą (odpowiednio o 30%, 62%, 81% i 67%). Obserwacje powyższe potwierdzają, że rezweratrol zmniejsza aktywację i agregację płytek krwi poprzez hamowanie płytkowego metabolizmu glukozy i produkcji energii. Co więcej, obserwowany spadek wydzielania płytkowego ATP i produkcji TXA₂ po zastosowaniu rezweratrolu wskazuje na to, że efekt przeciwpłytkowy tego związku może być spowodowany redukcją wydzielania i produkcji lokalnych agonistów receptorów płytkowych (Ryc. 1). Obserwacje te są zgodne z danymi, w których obserwowano, że rezweratrol, podobnie jak kwas acetylo-salicylowy hamuje aktywność cyklooksygenazy-1 i produkcji TXA₂, co prowadzi do inaktywacji płytek krwi i redukcji powikłań zakrzepowych (Zacharias-Millward i wsp. 2017). Tak więc, przeciwpłytkowe działanie rezweratrolu może mieć istotne znaczenie w profilaktyce przeciwwakrzepowej, szczególnie u pacjentów z opornością na aspirynę.

Zastosowany w pracy rezweratrol silniej hamował tworzenie skrzepu i płytkową produkcję TXA₂ u pacjentów z cukrzycą, w porównaniu do osób zdrowych, może to świadczyć o tym, że związek ten może być skuteczny w leczeniu powikłań zakrzepowych u pacjentów z hiperglikemią. Co więcej, silniejsze hamowanie przez rezweratrol aktywności akonitazy i dehydrogenazy izo-cytrynianowej w płytkach pacjentów z cukrzycą, niż u osób zdrowych wskazuje na to, że w warunkach hiperglikemii, rezweratrol wykazuje działanie przeciwpłytkowe poprzez redukcję metabolizmu tlenowego i produkcji energii.

Reasumując, rezweratrol blokował aktywację płytek krwi i redukował tworzenie skrzepu poprzez hamowanie metabolizmu glukozy, produkcji energii i wydzielania agonistów receptorów płytkowych. Przeciwpłytkowe działanie rezweratrolu było silniejsze u pacjentów z hiperglikemią. Moje obserwacje dotyczące mechanizmów działania rezweratrolu na aktywację i metabolizm płytek krwi osób zdrowych i pacjentów z hiperglikemią stanowią pierwsze w literaturze światowej doniesienie na ten temat.

Wnioski:

- a) Zwiększona agregacja oraz produkcja TXA₂ w płytkach krwi pacjentów z cukrzycą typu 2 jest spowodowana zwiększoną aktywnością enzymów odpowiedzialnych za metabolizm glukozy w warunkach hiperglikemii.
- b) Rezweratrol blokował aktywację płytek krwi poprzez hamowanie aktywności kluczowych enzymów odpowiedzialnych za utylizację glukozy i produkcję energii oraz przez redukcję wydzielania i produkcji agonistów aktywacji płytek krwi.
- c) Rezweratrol silniej blokował aktywację i metabolizm krwinek płytkowych w warunkach hiperglikemii.
- d) Rezweratrol może mieć potencjalnie korzystne działanie przeciwplatek w hiperglikemii u pacjentów w cukrzycą typu 2.

4. Wekwejt M , **Michno A.**, Truchan K, Pałubicka A, Świeczko-Żurek B , Osyczka AM , Zieliński A. 2019, Antibacterial Activity and Cytocompatibility of Bone Cement Enriched with Antibiotic, Nanosilver, and Nanocopper for Bone Regeneration. *Nanomaterials (Basel)*; 3;9(8):1114. IF = 4,324, punktacja MNiSW = 100,00;
Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: współtworzeniu hipotezy projektu dotyczącego wpływu modyfikowanych cementów kostnych na elementy morfotyczne krwi; opracowaniu schematu doświadczeń i wykonaniu doświadczeń dotyczących metabolizmu i aktywacji płytek krwi, edycja rozdziału „Wyniki” manuskryptu dotyczącym płytek krwi; redagowanie manuskryptu;

Celem badania było wykazanie, że modyfikowane cementy kostne wzbogacone substancjami o właściwościach antybakteryjnych w tym gentamycyną, nanocząstkami srebra lub nanocząstkami miedzi miały wpływ na metabolizm i aktywację płytek krwi, co mogłoby mieć wpływ na wystąpienie powikłań hemostatycznych u pacjentów po zabiegach alloplastyki.

Założenia pracy:

Zabiegi endoprotezoplastyki są stosowane w leczeniu zmian zwyrodnieniowych stawów oraz w traumatologii narządu ruchu w urazach kostnych i stawowych (w tym złamaniach szyjki kości udowej, złamaniach w okolicy krętarza, uzupełnieniu ubytków kostnych i stawowych czy stabilizacji kręgosłupa). Endoprotezoplastyka jest ponadto elementem oszczędzającego kończynę leczenia nowotworów kości - mięsaków. Zabiegi te są szeroko

rozpowszechnioną metodą leczenia i polegają na zastąpieniu naturalnego stawu lub fragmentu kości biomateriałem-endoprotezą, której zadaniem jest uzupełnienie lub zastąpienie wymienionego elementu, w celu wyeliminowania bólu, przywrócenia utraconej czynności i umożliwienia powrotu pacjenta do możliwie pełnej sprawności. Jednym z częściej wykonywanych rodzajów zabiegu alloplastyki jest endoprotezoplastyka cementowa, w której stosuje się cement kostny na bazie polimetakrylanu metylu (PMMA) do wypełnienia wolnej przestrzeni między protezą a kością. Klasyczny cement kostny PMMA odgrywa ważną rolę w strefie sprężystej absorbując siły działające w stawach (Radha i wsp. 2017). Niezależnie od właściwości biomechanicznych, biomateriał, w tym PMMA musi spełniać warunki biogodności, czyli charakteryzować się zdolnością prawidłowego zachowania w kontakcie z tkanką w określonym zastosowaniu. Biomateriał o dużej biogodności nie powinien być toksyczny dla otaczających tkanek, powodować hemolizy erytrocytów, wpływać na układ immunologiczny organizmu i wykazywać trombogenności w wyniku kontaktu krwi z jego powierzchnią (Robo i wsp. 2018, Inzana i wsp. 2016, Cenni i wsp. 2002). Do wczesnych powikłań alloplastyki przy użyciu PMMA oraz innych biomateriałów zalicza się miejscową infekcję, zapalenie kości i szpiku najczęściej wywołane przez odporne szczepy gronkowca złocistego, żylną chorobę zakrzepową, zatorowość płucną czy nadmierne krwawienie pooperacyjne. Dlatego też, istnieje potrzeba tworzenia modyfikowanych biomateriałów o właściwościach przeciwbakteryjnych i atrombogenicznych (Burdusel i wsp. 2018, Zheng i wsp. 2018, Przekora i wsp. 2019).

Opis uzyskanych wyników:

Zawiesina płytek krwi (3×10^8 /mL) była inkubowana z dyskowatymi elementami cementów kostnych: PMMA (BC) zawierającymi 1,5% siarczanu gentamycyny (BC-NpA), PMMA wzbogaconymi 1,5% nanocząstek srebra (Ag, BC-NpAg) (o rozmiarze 50nm), 1,5% nanocząstek miedzi (Cu, BC-Np.-Cu) (o rozmiarze 50nm), w 37°C przez 2 min i 2h. Następnie zawiesina płytek krwi była przenoszona do kuwet agregacyjnych, w których badano stopień aktywacji płytek krwi jako ich zdolność do agregacji spontanicznej i indukowanej trombiną (0.1 μ m/mL) zarówno we wczesnym etapie aktywacji (agregacja po 1min. po dodaniu trombiny) jak i późnej agregacji (10 min). Przeżywalność płytek krwi była analizowana poprzez oznaczanie aktywności mitochondrialnej dehydrogenazy bursztynianowej przy użyciu testu MTT.

W przedstawionej pracy wykazano, że ekspozycja płytek krwi na PMMA nie miała wpływu na aktywację płytek krwi i ich spontaniczną agregację. Zarówno, cementy PMMA wzbogacone siarczanem gentamycyny, jak i PMMA z nanocząstkami Ag oraz nanocząstkami Cu nie aktywowały płytek krwi, zarówno w trakcie krótkiej (2min), jak i długoterminowej (2h) ekspozycji. Podobnie, cement PMMA nie miał wpływu zarówno na wczesną fazę agregacji (po 1 min), jak i późną fazę agregacji płytek krwi aktywowanych trombiną (po 10 min) (Ryc. 1). Z drugiej strony, cement PMMA wzbogacony siarczanem gentamycyny hamował po 2h ekspozycji zarówno wczesną, jak i późną fazę agregacji indukowanej trombiną, odpowiednio o 57% i 39% w porównaniu do niemodyfikowanego cementu PMMA (Ryc. 1). Cement PMMA wzbogacony nanocząstkami Ag, nie hamował istotnie indukowanej trombiną aktywacji i agregacji płytek krwi zarówno po 2min, jak i po 2h ekspozycji. Natomiast 2h ekspozycja płytek krwi na cement PMMA zawierający nanocząstki Cu zahamowała istotnie aktywację i agregację płytek krwi indukowaną trombiną po 2min i 2h inkubacji odpowiednio o 91% i 66%, w porównaniu do cementów PMMA (Ryc. 1). Tak więc, cementy kostne PMMA wzbogacone siarczanem gentamycyny i nanocząstkami Cu hamowały agregację płytek krwi aktywowanych trombiną, zarówno we wczesnej fazie, jak i późnej fazie agregacji. Jednakże, fakt, że redukcja agregacji była słabsza w późnej fazie agregacji, może świadczyć o tym, że efekt ten był częściowo odwracalny.

Przeżywalność płytek krwi eksponowanych przez 2h na cementy PMMA, PMMA z gentamycyną i PMMA z nanocząstkami Ag była porównywalna do warunków kontrolnych. Natomiast PMMA zawierający nanocząstki Cu istotnie redukował przeżywalność o 60% w porównaniu do PMMA bez domieszek. Tak więc, cementy PMMA, PMMA zawierające gentamycynę i PMMA z Ag nie miały wpływu na metabolizm energetyczny mierzony aktywnością dehydrogenazy bursztynianowej w teście MTT. Natomiast PMMA wzbogacony nanocząstkami Cu hamował metabolizm energetyczny płytek krwi. Wskazuje to, że tego typu cement mógłby redukować przeżywalność płytek krwi i wykazywać działanie przeciwpłytkowe w warunkach *in vivo*.

Wyniki przeprowadzonych badań wskazują, że cementy kostne wzbogacone substancjami przeciwbakteryjnymi mogą modyfikować metabolizm i aktywację płytek krwi. Dlatego też, niezbędna jest ocena wpływu modyfikowanych biomateriałów na aktywację płytek krwi, w celu oceny ryzyka zakrzepowego lub krwawienia przed ich zastosowaniem u pacjentów poddawanych zabiegom endoprotezoplastyki cementowej.

Wnioski:

- a) Cementy kostne PMMA, oraz PMMA wzbogacone gentamycyną, nanocząstkami Ag i nanocząstkami Cu nie miały wpływu na agregację spontaniczną płytek krwi w warunkach in vitro. Obserwacja ta sugeruje, że ich stosowanie nie zwiększa ryzyka prozakrzepowego/ atrombogenności w warunkach klinicznych
- b) Cementy kostne PMMA oraz PMMA nanoAg nie miały wpływu na indukowaną trombiną agregację płytek krwi oraz na płytkowy mitochondrialny metabolizm energetyczny co może świadczyć, o tym, że ich stosowanie nie zwiększy ryzyka powikłań krwotocznych czy zakrzepowych u pacjentów.
- c) Cement kostny PMMA z gentamycyną istotnie redukował aktywację i agregację płytek krwi, co mogłoby wiązać się z ryzykiem krwawienia pooperacyjnego u pacjentów, u których zastosowano by taki biomateriał.
- d) Fakt, że PMMA wzbogacony nanocząstkami Cu istotnie redukował zarówno agregację jak i przeżywalność płytek krwi, może świadczyć, o tym, że taka postać cementu kostnego może być bardziej toksyczna dla płytek krwi niż inne cementy PMMA i stwarzać większe ryzyko powikłań krwotocznych u pacjentów.

5. Roberts W, **Michno A**, Aburima A, Naseem KM. 2009, Nitric oxide inhibits von Willebrand factor-mediated platelet adhesion and spreading through regulation of integrin α (IIb) β (3) and myosin light chain. *J Thromb Haemost*;7 (12): 2106. IF = 6,069, punktacja MNiSW = 32;

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: współprzygotowaniu hipotezy projektu dotyczącej wpływu tlenku azotu na tworzenie skrzepu w warunkach in vitro oraz potwierdzeniu, że tlenek azotu redukuje tworzenie skrzepu i agregację płytek krwi w warunkach przepływu naczyniowego w warunkach in vitro, opracowaniu schematu doświadczeń z przepływami in vitro, dokonaniu analizy tworzenia skrzepu i tworzenia agregatów płytkowych, przygotowanie rycin, współredagowaniu manuskryptu;

Celem przeprowadzonych badań było określenie mechanizmów działania tlenku azotu (NO) na zależną od czynnika von Willebranda (VWF) aktywację płytek krwi w tym: adhezję, zmianę kształtu i ich agregację.

Założenia pracy:

Adhezja płytek krwi w miejscu uszkodzenia ściany naczynia krwionośnego odgrywa istotną rolę w hamowaniu krwawienia. Natomiast niekontrolowany proces adhezji płytek krwi może doprowadzić do okluzji naczyń krwionośnych. Wczesna faza adhezji płytek krwi ze składnikami macierzy podśródbłonkowej zachodzi dzięki wiązaniu glikoproteiny (GP), Ib-IX-V z czynnikiem von Willebranda (VWF). W warunkach przyływu krwi interakcja GPIb z VWF umożliwia przejściową adhezję płytek krwi do ściany naczynia, co w konsekwencji aktywuje integrynę $\alpha_{IIb}\beta_3$ oraz $\alpha_2\beta_1$. Aktywacja tych integryn prowadzi do zmiany kształtu i zwiększenia powierzchni płytek krwi, stabilizuje ich adhezję i umożliwia dalszą aktywację i agregację. W warunkach fizjologicznego przepływu krwi, płytki krwi krążące w pobliżu i w interakcji ze śródbłonkiem naczyniowym są ekspozowane na endogenne śródbłonkowy tlenek azotu (NO) i prostacyklinę (PGI_2), które to hamują spontaniczną aktywację płytek krwi w nieuszkodzonym naczyniu krwionośnym. Wiązanie płytek krwi z VWF stanowi wstępną fazę hemostazy i tworzenia skrzepu, tak więc istotne wydawało mi się zbadanie wpływu NO na wstępną aktywację płytek krwi aktywowanych VWF.

Opis uzyskanych wyników:

Podczas pobytu w Uniwersytecie Bradford razem z członkami zespołu prof. Khalida Naseem podjęłam się zbadania wpływu S-Nitrozoglutathionu (GSNO), który jest stabilną formą NO na zależną do VWF aktywację płytek krwi zarówno w warunkach statycznych, jak i tworzenia skrzepu w warunkach *in vitro*. W wyniku przeprowadzonych badań potwierdzono, że GSNO uwalniający NO w stężeniach zbliżonych do fizjologicznych w naczyniach krwionośnych (0,1-100 μ M) hamował agregację płytek krwi aktywowanych przez VWF zarówno w warunkach statycznych, jak i poddanych przepływowi w warunkach *in vitro* zbliżonych do warunków reologicznych w naczyniach tętniczych. Efekt GSNO był zależny od stężenia i skorelowany z produkcją cyklicznego GMP (cGMP). GSNO nie powodował całkowitej redukcji adhezji płytek krwi aktywowanych VWF, co sugerowałoby, że NO nie ma wpływu na wstępną fazę adhezji płytek krwi.

W celu oceny mechanizmów działania NO na aktywację płytek krwi w tym: adhezję, zmianę kształtu i agregację płytek krwi aktywowanych przez VWF zastosowano czynniki blokujące interakcje płytkowej GPIb i integryny $\alpha_{IIb}\beta_3$ z VWF. Interakcja GPIb z VWF była wystarczająca do adhezji płytek krwi, podczas gdy zmiana ich kształtu i agregacja wymagały również aktywacji integryny $\alpha_{IIb}\beta_3$. Dane te były zgodne z badanymi innych autorów, którzy wykazali, że GPIb indukuje aktywację $\alpha_{IIb}\beta_3$ w celu stabilizacji adhezji i przyspieszenia

agregacji płytek krwi aktywowanych przez VWF (Yap i wsp. 2002). Wykazano, że po zastosowaniu przeciwciał Mab6D1, które blokowały interakcje GPIb-VWF, a tym samym izolowały interakcję VWF z płytkowymi $\alpha_{IIb}\beta_3$, zastosowany GSNO całkowicie znosił adhezję i agregację płytek krwi. Natomiast GSNO nie miał wpływu na zależną od VWF aktywację płytek krwi, w których blokowano integrynę $\alpha_{IIb}\beta_3$. Mogło to świadczyć o tym, że NO hamuje zależną od VWF aktywację płytek krwi poprzez inaktywację integryn płytkowych, i jednocześnie NO nie ma wpływu na interakcję płytkowej GPIb z VWF (Ryc. 1).

Wiadomo, że wiązanie płytkowej GPIb z VWF jest hamowane w mechanizmie zależnym od aktywacji ścieżki sygnalizacyjnej zależnej od cAMP-PKA (cykliczny AMP-kinaza białkowa A) (Bodnar i wsp. 2002). Wiadomo też, że NO hamuje aktywację płytek krwi poprzez aktywację PKA (Li i wsp. 2003). W naszych badaniach po raz pierwszy wykazano, że NO nie ma wpływu zarówno na aktywację PKA, jak i na płytkową interakcję GPIb-VWF. Ponadto udowodniono, że NO hamował aktywację integryny $\alpha_{IIb}\beta_3$ w odpowiedzi na VWF, co może wiązać się z zahamowaniem przez NO fosforylacji ERK i p38, ścieżek sygnalizacyjnych biorących udział w aktywacji integryn płytkowych (Li i wsp. 2001). Tak więc, NO hamuje aktywację płytek krwi poprzez bezpośrednie hamowanie aktywacji integryny $\alpha_{IIb}\beta_3$, zaś nie ma wpływu na adhezję płytek krwi aktywowaną przez GPIb (Ryc. 1).

Wykazano również, że aktywacja i zmiana kształtu płytek krwi na powierzchni VWF wymaga fosforylacji lekkiego łańcucha miozyny (MLC) w celu reorganizacji struktury cytoszkieletu płytkowego. W obecności GSNO obserwowano całkowite zahamowanie fosforylacji MLC, co sugeruje, że NO może blokować aktywację płytek krwi zależną od VWF poprzez hamowanie interakcji aktyna-miozyna. Wiadomo, że fosforylacja MLC podlega wzajemnej regulacji aktywności kinazy MLC i fosfatazy MLC (Bauer i wsp. 1999). W warunkach blokowania aktywności fosfatazy MLC, GSNO nie miał wpływu na fosforylację MLC. Dane te wskazują, że NO odgrywa istotną rolę w regulacji kształtu płytek krwi poprzez aktywację fosfatazy MLC, co jest zgodne z obserwacjami innych badaczy w komórkach mięśni gładkich naczyń krwionośnych (Bolz i wsp. 2003).

Badania nasze dostarczyły nowych informacji na temat mechanizmu działania NO na zależną od VWF wczesną aktywację płytek krwi. Wyniki tych badań mogą posłużyć do projektowania nowoczesnych leków przeciwplatekcyjnych.

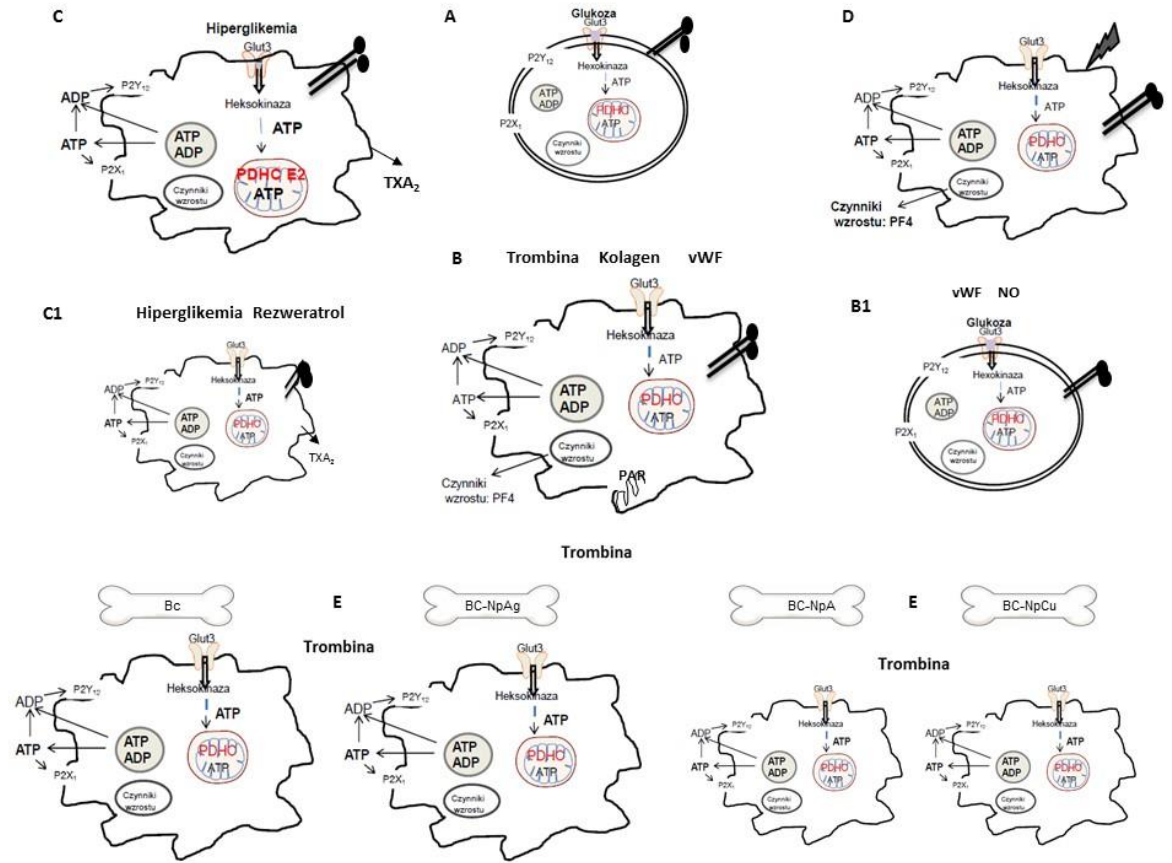
Wnioski:

- a) Tlenek azotu (NO) hamuje wczesną aktywację płytek krwi poprzez redukcję fosforylacji MLC zarówno poprzez blokowanie integryny $\alpha_{IIb}\beta_3$, która jest wymagana do maksymalnej fosforylacji MLC, jak i poprzez aktywację fosfatazy MLC.
- b) NO redukuje rekrutację płytek krwi, ich agregację i zmianę kształtu, ale nie ma wpływu na adhezję płytek krwi aktywowanych przez czynnik von Willebranda (VWF).
- c) Działanie NO polega na hamowaniu aktywacji integryny $\alpha_{IIb}\beta_3$, natomiast nie ma wpływu na wstępną interakcją płytkowej GPIb z VWF.
- d) NO może redukować tworzenie skrzepu poprzez hamowanie agregacji płytek krwi, przy jednoczesnym zachowaniu zdolności płytek krwi do adhezji.
- e) Stabilne analogii tlenku azotu mogą mieć potencjalnie korzystne działanie przeciwplatek, przy jednoczesnym mniejszym ryzyku powikłań krwotocznych.

WNIOSKI WYNIKAJĄCE Z CYKLU PRAC

Czynniki egzogenne stosowane w ortopedii i medycynie regeneracyjnej takie jak modyfikowane nanocząstkami metali cementy kostne, osocze bogatopłytkowe czy pulsacyjna radiofrekwencja, jak również w farmakoterapii, w tym związki o właściwościach przeciwplatek takich jak analogii tlenku azotu czy roślinne polifenole (rezweratrol), jak i endogenne towarzyszące zaburzeniom metabolicznym w cukrzycy są z punktu widzenia klinicznego istotne. Ocena metabolizmu, w tym aktywności i ekspresji dehydrogenazy pirogronianowej czy dehydrogenazy bursztynianowej i funkcji płytek krwi (takich jak wydzielanie zawartości ziarnistości czy agregacja) może być użytecznym markerem do oceny efektu przeciwplatekowego i ryzyka powikłań hemostatycznych u pacjentów zarówno w stanach patologicznych, jak i podczas ich leczenia w diabetologii, ortopedii czy medycynie regeneracyjnej i zwalczaniu bólu.

1. Zarówno czynniki egzogenne stosowane w medycynie regeneracyjnej i w farmakoterapii, jak i endogenne towarzyszące zaburzeniom metabolicznym mogą modyfikować metabolizm i aktywację płytek krwi.
2. Czynniki te modyfikują funkcje płytek krwi poprzez wpływ na mechanizmy regulacji wewnątrzplatekowej.
3. Ocena funkcji i metabolizmu płytek krwi może być pomocniczym markerem oceniającym ryzyko powikłań hemostatycznych lub korzyści użycia nowoczesnych biomateriałów, technik leczniczych lub związków o działaniu przeciwplatekowym zarówno u pacjentów w diabetologii, w ortopedii, jak i w medycynie regeneracyjnej.



Ryc. 1 Aktywacji płytek krwi w wybranych warunkach klinicznych

Glut3 transporter glukozy typu 3

PDHC kompleks enzymów dehydrogenazy pirogronianowej

PDHCE2 podjednostka E2 PDHC (transacetylazy dihydrolipoiu)

PAR receptory aktywowane przez proteazę



Pulsacyjna Radiofrekwencja



aktywowana płytkowa GP IIb/IIIa



nieaktywowana lub częściowo aktywowana GP IIb/IIIa

BC cement kostny na bazie polimetakrylanu metylu (PMMA)

BCNpAg cement kostny na bazie polimetakrylanu metylu (PMMA) wzbogacony nanocząstkami srebra

BCNpA cement kostny na bazie polimetakrylanu metylu (PMMA) wzbogacony antybiotykiem (siarczanem gentamycyny)

BCNpCu cement kostny na bazie polimetakrylanu metylu (PMMA) wzbogacony nanocząstkami miedzi

- (A) Glukoza jest podstawowym substratem energetycznym dla płytek krwi i jest ona transportowana do wnętrza płytek krwi przez transporter glukozy typu 3, który jest niezależny od insuliny.
- (B) Aktywowane trombiną lub innymi agonistami (kolagenem, czynnikiem von Willebranda) płytki krwi wykazują przyspieszony transport glukozy i jej przemianę w szlaku glikolizy, wysoką aktywność dehydrogenazy pirogronianowej transportującej pirogronian do mitochondriów, gdzie jest on utylizowany w cyklu kwasów trójkaboksylowych do produkcji ATP. Aktywowane trombiną płytki krwi uwalniają ziarnistości gęste (zawierające ATP i ADP) oraz ziarnistości alfa (zawierające czynniki wzrostu, mitogenne czy czynniki krzepnięcia).
- (B1) Stabilny analog tlenu azotu: GSNO hamuje aktywację GPIIb/IIIa, natomiast nie ma wpływu na wstępną interakcję płytkowej GPIb z VWF.
- (C) W warunkach przewlekłej hiperglikemii dochodzi do zwiększonego napływu glukozy do wnętrza płytek krwi, przyspieszonego metabolizmu glukozy w szlaku glikolizy oraz przyspieszonego transportu pirogronianu do cyklu kwasów trójkarboksylowych w wyniku zwiększonej aktywności PDHC zależnej od zwiększenia ekspresji podjednostki E2 PDHC. Przyspieszony metabolizm energetyczny i zwiększona produkcja i uwalnianie ATP i ADP oraz produkcja TXA₂ prowadzą do nadmiernej aktywacji płytek krwi u pacjentów z cukrzycą.
- (C1) Rezweratrol hamuje nadmierną aktywację płytek krwi w hiperglikemii poprzez zmniejszenie ich metabolizmu energetycznego i produkcji TXA₂.
- (D) Pulsacyjna Radiofrekwencja (PRF) aktywuje płytki krwi w mechanizmie zależnym od zwiększenia wydzielania zarówno ziarnistości gęstych, jak i alfa, które są źródłem czynników wzrostu, biorących udział w procesie regeneracji komórek i tkanek. Jednocześnie radiofrekwencja nie ma wpływu na metabolizm płytek krwi i ich integralność.
- (E) Cementy kostne Bc oraz Bc-NpAg nie mają wpływu zarówno na spontaniczną, jak i na indukowaną trombiną agregację płytek krwi oraz na płytkowy mitochondrialny metabolizm energetyczny. Natomiast cementy BcNp-A i BcNp-Cu istotnie redukują aktywację i agregację płytek krwi. BCNp-Cu istotnie zmniejsza metabolizm mitochondrialny.

Omówienie pozostałych osiągnięć

a) Ocena odpowiedzi immunologicznej w raku płaskonabłonkowym głowy i szyi

Nowotwory głowy i szyi stanowią 6% wśród wszystkich nowotworów złośliwych w Europie. Około 90% guzów głowy i szyi powstaje z komórek nabłonka płaskiego wyściełającego jamę nosowo-gardłową, część ustną i krtaniową gardła, tworząc podgrupę raka płaskonabłonkowego głowy i szyi (HNSCC, *Head and Neck Squamous Cell Carcinoma*). U pacjentów z HNSCC obserwuje się osłabienie odpowiedzi immunologicznej, a redukcja masy guza bez interwencji terapeutycznej jest rzadko obserwowana. Hamowanie układu odpornościowego przez komórki nowotworowe jest związane z produkcją cytokin, w tym chemokin, które mogą zaburzać równowagę pomiędzy limfocytami T regulatorowymi a cytotoksycznymi, pomocniczymi czy komórkami dendrydycznymi (Albers i wsp. 2010, Alhamarneh i wsp. 2011). W grupie pacjentów z HNSCC obserwuje się wzrost populacji regulatorowych limfocytów (Treg, *T regulatory*) zarówno w krążeniu obwodowym, jak i w mikrośrodowisku guza. Cechą Treg jest posiadanie receptorów chemokin, co umożliwia im zdolność migracji do miejsc objętych procesem zapalnym i tłumienie odpowiedzi immunologicznej. Dlatego też postuluje się, że Treg mogą hamować działanie limfocytów pomocniczych i cytotoksycznych sprzyjając ucieczce HNSCC spod kontroli układu immunologicznego przyczyniając się do wczesnej progresji choroby nowotworowej (Green i wsp. 2012, Duray i wsp. 2010).

Nie ma jednoznacznych danych potwierdzających, że obecność limfocytów naciekających guz jest czynnikiem prognostycznie korzystnym czy niekorzystnym u pacjentów z HNSCC. Postuluje się, że postęp choroby HNSCC może być związany ze wzajemnym oddziaływaniem nowotworowo zmienionych limfocytów z komórkami Treg oraz z miejscem pochodzenia guza. W naszych pracach zbadano występowanie limfocytów naciekających (TIL, *tumour infiltrating lymphocytes*) (CD4, CD8 i FOXP3) w próbkach HNSCC zarówno w jego zrębie, jak i w mięszu, pobranych w trakcie operacji usunięcia guza od 66 pacjentów. Razem z zespołem prof. Johna Greenmana dokonałam również oceny wpływu HNSCC na profil cytokin w krążeniu obwodowym pochodzących od limfocytów pomocniczych (Th) subpopulacji Th1 i Th2. W tym celu porównywano poziomy cytokin w surowicy w grupie 101 pacjentów zarówno przed, jak i po operacji usunięcia guza HNSCC. Profil oznaczonych limfocytów i cytokin był korelowany ze stopniem zaawansowania nowotworu w skali TNM (*Tumor, Nodus, Metastases*), lokalizacją anatomiczną, w tym w obrębie jamy ustnej, języka, migdałków, części

krtaniowej gardła i krtani oraz ilością obwodowych limfocytów Treg (o fenotypie CD4+CD25highFOXP3) określoną przy użyciu cytometrii przepływowej. Celem naszych badań była identyfikacja biomarkerów prognostycznych u pacjentów z HNSCC.

Zrąb (*stroma*) jako integralny składnik utkania nowotworów decyduje o biologii tkanki nowotworowej, gdyż zespala i odżywia guz. Stan zrębu, a zwłaszcza jego unaczynienie i naciek komórkowy, wpływają na rozwój komórek mięsaszowych nowotworu. Dlatego też, badaliśmy ilość TIL w zrębie guzów HNSCC. Zawartość badanych TIL w zrębie HNSCC była skorelowana z zawartością TIL w komórkach mięsaszowych guzów. Jednocześnie ilość TIL była większa w zrębie, w porównaniu do mięsasz guza. Obserwacja ta mogła sugerować, że komórki układu odpornościowego akumulują się w zrębie HNSCC przed migracją do mięsasz nowotworu lub też wpływają na stan zrębu nowotworowego co może mieć istotne znaczenie w rozwoju guza. Wykazano zwiększoną ilość TIL o fenotypie CD4⁺ i FOXP3 w tkance nowotworu części krtaniowej gardła, w porównaniu do innych lokalizacji HNSCC, w tym krtani. Mogłoby to sugerować, że lepsze rokowanie w tej grupie HNSCC może wynikać ze zwiększonej odpowiedzi immunologicznej (Ang i wsp. 2010).

Zaobserwowano, że odsetek Treg (o fenotypie CD4+CD25highFOXP3) we krwi obwodowej pacjentów z HNSCC był podobny niezależnie od lokalizacji guza. Jednak u pacjentów w zaawansowanym stopniu (T3/T4) raka krtani wykazano wyższy odsetek Treg w krążeniu, w porównaniu do mniej zaawansowanego stadium (T1/T2). Może to potwierdzać tezę innych badaczy, o tym, że zwiększona populacja Treg w zaawansowanym HNSCC przyczynia się do supresji układu odpornościowego i przyspieszonego rozwoju nowotworu. Obserwowany też wyższy odsetek limfocytów pomocniczych (CD4⁺ bez obecnego FOXP3) u pacjentów z rakiem części krtaniowej gardła bez przerzutu nowotworu do regionalnych węzłów chłonnych, w porównaniu do pacjentów z przerzutami, może sugerować istotny udział limfocytów efektorowych układu odpornościowego w zapobieganiu przerzutom HNSCC w tej lokalizacji guza.

W celu oceny wpływu HNSCC na profil cytokin w krążeniu obwodowym oceniano poziomy IL2, IL4, IL5, IL6, IL8, IL10, IL13, GM-CSF, IFN γ i TNF α w surowicy 101 pacjentów ze świeżo rozpoznanym HNSCC zarówno przed, jak i po leczeniu operacyjnym. Obserwowano znamienne spadki poziomu cytokin Th2 (IL4, IL5, IL6 oraz IL10) oraz cytokin Th1 (IL2 and IL8) po operacji usunięcia guza w porównaniu do stanu przed operacją. Poziomy IL13 i TNF α były wyższe w mniej zaawansowanym stadium (T1/T2), w porównaniu do zaawansowanego

stadium (T3/T4) oraz u pacjentów z przerzutami HNSCC do węzłów chłonnych. Poziomy IL4 były wyższe u pacjentów z przerzutami HNSCC do węzłów chłonnych.

W naszych badaniach potwierdzono, że stopień naciekania tkanki HNSCC przez komórki układu odpornościowego może zależeć od lokalizacji guza i odpowiedzi immunologicznej w krążeniu obwodowym pacjentów. Wykazano również, że usunięcie masy HNSCC miało wpływ na redukcję krążących we krwi obwodowej cytokin Th2 ale bez wpływu na poziomy cytokin Th1. Co więcej, profil cytokin był zależny od wielkości guza i przerzutów do węzłów chłonnych. Tak więc wyniki naszych badań mogą mieć znaczenie w ustaleniu biomarkerów prognostycznych u pacjentów z HNSCC.

Publikacje:

Green VL, **Michno A**, Greenman J, Stafford ND. Effect of treatment on systemic cytokines in head and neck squamous cell carcinoma patients. Results Immunol. 2011 Dec 17; 2:1-6.

Green VL, **Michno A**, Stafford ND, Greenman J. Increased prevalence of tumour infiltrating immune cells in oropharyngeal tumours in comparison to other subsites: relationship to peripheral immunity. Cancer Immunol Immunother. 2013 May;62 (5): 863-73.

b) Toksyczność jonów metali przejściowych i ich korelacje z innymi zmianami patofizjologicznymi.

Jony metali przejściowych w tym jony cynku i wanadu są mikroelementami i odgrywają istotną rolę jako katalizatory reakcji biochemicznych. W dawkach terapeutycznych jony cynku i wanadu wykazują działanie neuroprotektoryjne poprzez poprawę metabolizmu energetycznego neuronów mózgu. Wiadomo też, że jony wanadu mogą hamować apoptozę komórek nerwowych czy poprawiać przepływ krwi w naczyniach mózgowych szczególnie w warunkach niedotlenienia. Jony cynku są zlokalizowane w pęcherzykach synaptycznych neuronów glutaminergicznych. Co więcej, cynk jest uważany za wewnątrzkomórkowy przekaźnik sygnałowy, ponieważ posiada on zdolność do oddziaływania na inne mediatory. Z drugiej strony, wysokie stężenia jonów metali przejściowych w tym jonów cynku i wanadu mogą wywierać działanie neurotoksyczne.

Wiadomo, że stany niedotlenienia, urazy czaszki czy przewlekły stres oksydacyjny mogą prowadzić do stanu przedłużenia depolaryzacji neuronów, a w konsekwencji do uwolnienia wysokich i toksycznych stężeń jonów cynku z pęcherzyków wydzielniczych neuronów do przestrzeni międzykomórkowej. Tak uwolnione jony cynku o stężeniu powyżej 150 mM

akumulują się w neuronach postsynaptycznych i mogą hamować aktywność enzymów zarówno NAD- jak i, NADP-zależnych. Prowadzi to do zwiększonej śmiertelności neuronów cholinergicznycy w wyniku zmniejszenia produkcji acetylo-CoA a w konsekwencji do obniżenia produkcji energii, jak również do obniżenia syntezy neuroprzekaźnika-acetylocholiny (ACh). W efekcie prowadzi to do rozwoju chorób neurodegeneracyjnych takich jak choroba Alzheimera (Szutowicz i wsp. 2017). Dlatego też, moje kolejne prace poświęcone były badaniu toksyczności jonów cynku i jego korelacji z innymi patofizjologicznymi zmianami w neuronach cholinergicznycy oraz ich wpływowi na metabolizm N-acetyloasparagianu (NAA).

NAA jest produkowany przez neuronalną N-acetylotransferazę (NAT8L) z acetylo-CoA i asparagianu i odgrywa istotną rolę m.in. w utrzymaniu osmolalności neuronów, syntezie lipidów i mieliny. Jednakże rola NAA w metabolizmie energetycznym neuronów nie jest dokładnie poznana. Dlatego też, w badaniach Zakładzie Medycyny Laboratoryjnej, Katedry Biochemii Klinicznej, GUMed dokonano oceny syntezy NAA i jego dystrybucję w neuronach cholinergicznycy.

W neuronalnych komórkach cholinergicznycy (linia komórkowa SN56), które były ekspozowane na toksyczne stężenie jonów Zn^{2+} obserwowano hamowanie aktywności NAT8L i obniżenie poziomu NAA (Zyśk i wsp. 2017). Produkcja NAA jest zależna od mitochondrialnego cyklu kwasów trójkarboksylowych i systemu transportu jabłczan-asparagianu. Dlatego też w naszych badaniach dokonano oceny zawartości NAA we frakcji mitochondrialnej. Po raz pierwszy wykazano, że mitochondria komórek cholinergicznycy zawierały 85-90% całkowitej puli NAA i NAT8L. W naszych badaniach potwierdzono, że zarówno krótko-, jak i długoterminowa inkubacja komórek SN56 w obecności 0.15mM Zn^{2+} prowadziła do spadku zawartości mitochondrialnego asparagianu i acetoctanu oraz NAA. Ponadto Zn^{2+} hamował aktywność NAT8L. Nasze prace dostarczyły również pierwszych bezpośrednich dowodów, wskazujących że hamowanie produkcji NAA wywołane nadmierną akumulacją Zn^{2+} jest zależne od mitochondrialnych niedoborów acetylo-CoA i asparagianu. Kolejne prace przeprowadzono w celu zbadania toksyczności jonów cynku i jego korelacji z subklinicznym niedoborem pirofosforanu tiaminy (TPP). Jest to zjawisko często występujące w krajach rozwiniętych szczególnie wśród ludzi w podeszłym wieku, którzy wykazują się ograniczeniami ruchowymi, poznawczymi lub utrudniającymi przyjmowanie pełnowartościowej diety. Ponadto niedobory TPP diagnozowano u osób z uzależnieniami od alkoholu oraz u przewlekle chorych leczonych antymetabolitami B₁. Poza objawami

klinicznymi wynikającymi z niedoborów, uważa się, że subkliniczny niedobór TPP sprzyja rozwojowi choroby Alzheimera i innych typów encefalopatii.

TPP jest kofaktorem reakcji katalizowanej przez PDHC przez co reguluje szybkość syntezy acetylo-CoA. Wiadome jest, że graniczne sygnały neurotoksyczne występują często w patologiach układu nerwowego u ludzi. Dlatego przypuszcza się, że jednoczesne wystąpienie kilku słabych bodźców cytotoksycznych mogłoby wzajemnie nasilać swoje działanie szczególnie w początkowych stadiach encefalopatii. W związku z powyższym zbadaliśmy zależność między stanami subklinicznej hipowitaminozy, a innymi podprogowymi sygnałami. Jednym z nich jest podwyższone stężenie jonów cynku.

Wykazano, że komórki neuronalne SN56 są wrażliwe na stężenia jonów cynku powyżej 0.15 mmol/L. Obserwowano, że hodowla komórek neuronalnych SN56 zróżnicowanych do fenotypu cholinergicznego, w środowisku o niskiej zawartości tiaminy, nie prowadziła ani do spadku ich liczby ani nie wpływała na integralność metaboliczną komórek. Z drugiej strony w takich warunkach niskie, 0.10 mmol/L stężenia Zn ujawniały silne działanie cytotoksyczne wynikające z jego nadmiernej akumulacji w komórkach. Co więcej Zn akumulowany w komórkach z silnym niedoborem TPP prowadził do dalszego pogłębienia niedoboru tej witaminy. Ponadto wykazano silne hamowanie aktywności enzymów metabolizmu energetycznego: PDHC, KDHC, akonitazy i ICDH. W efekcie dochodziło do obniżenia poziomu mitochondrialnego i wtórnie do spadku cytoplazmatycznego poziomu acetylo-CoA. Prowadziło to do obniżenia poziomu ACh.

Dodatkowo, udowodniono, że komórki astrogleju posiadają potencjał cytoprotekcyjny w stosunku do neuronalnych komórek SN56, zabezpieczając je przed neurotoksycznym działaniem jonów Zn, w warunkach niedoboru pirofosforanu tiaminy. Prawdopodobnie jest to spowodowane zmniejszeniem akumulacji jonów Zn w komórkach neuronalnych oraz zwiększeniem poziomu pirofosforanu tiaminy w komórkach SN56, co zapobiega hamowaniu aktywności kompleksu dehydrogenazy pirogronainowej i obniżeniu poziomu acetylo-CoA. Uzyskane wyniki wskazują, że optymalny poziom TPP wykazuje działanie ochronne przed nadmierną akumulacją jonów Zn np. w warunkach przedłużonej depolaryzacji neuronów obserwowanej w chorobach neurodegeneracyjnych. W przedstawianym cyklu prac wykazano również, że komórki astrogleju, zarówno komórki pierwotne, jak i linia komórkowa C6 charakteryzują się znacznie mniejszą wrażliwością na bodźce neurotoksyczne niż neurony.

Publikacje:

Gul-Hinc S, **Michno A**, Zyśk M, Szutowicz A, Jankowska-Kulawy A, Ronowska A. Protection of Cholinergic Neurons against Zinc Toxicity by Glial Cells in Thiamine-Deficient Media. *Int J Mol Sci*. 2021 Dec 11; 22(24): 13337.

Ronowska A, Gul-Hinc S, **Michno A**, Bizon-Zygmańska D, Zyśk M, Bielarczyk H, Szutowicz A, Gapys B, Jankowska-Kulawy A. Aggravated effects of coexisting marginal thiamine deficits and zinc excess on SN56 neuronal cells. *Nutr Neurosci*. 2019 Jul 22: 1-11.

Zyśk M, Sakowicz-Burkiewicz M, Pikul P, Kowalski R, **Michno A**, Pawelczyk T. The Impact of Acetyl-CoA and Aspartate Shortages on the N-Acetylaspartate Level in Different Models of Cholinergic Neurons. *Antioxidants (Basel)*. 2020 Jun 13; 9(6): 522.

Gruzewska K, **Michno A**, Pawelczyk T, Bielarczyk H. Essentiality and toxicity of vanadium supplements in health and pathology. *J Physiol Pharmacol*. 2014 Oct; 65(5) :603-11.

c) Ocena skuteczności antybakteryjnej, biozgodności i bezpieczeństwa modyfikowanych cementów kostnych

Częstym powikłaniem poimplantacyjnym jest zakażenie bakteryjne. Dlatego też istnieje potrzeba tworzenia implantów wzbogaconych substancjami o właściwościach przeciwbakteryjnych. We wcześniejszych badaniach wykazano, że cementy akrylowe (PMMA) wzbogacone nanocząstkami srebra (BC-AgNp) charakteryzowały się szerokimi i efektywnymi właściwościami przeciwbakteryjnymi i biozgodnością. Jednakże, cementy te nie posiadały właściwości bioaktywnych i biodegradowalnych (Wekwejt i wsp. 2020).

W moich kolejnych badaniach prowadzonych we współpracy z Zakładem Technologii Biomateriałów Politechniki Gdańskiej dokonano oceny właściwości cementów akrylowych wzbogaconych bioaktywnym szkłem (bioszkło 45S5, 1393-B3 oraz bioszkłem otrzymanym metodą zol-żel SiO_2/CaO) w celu uzyskania zmiennej w czasie porowatości umożliwiającej stopniowe uwalnianie z cementu substancji aktywnych takich jak nanocząstki srebra, w celu poprawy ich biozgodności, właściwości antybakteryjnych i możliwości stosowania w praktyce klinicznej u pacjentów. W tak modyfikowanych cementach analizowano ich następujące właściwości: mikrostrukturę, temperaturę polimeryzacji i czas wiązania, zwilżalność, właściwości mechaniczne, porowatość, stopień uwalniania z cementu składników aktywnych, biozgodność i właściwości przeciwbakteryjne.

Na podstawie przeprowadzonych badań wykazano, że w zależności od rodzaju i stężenia zastosowanych modyfikatorów w cementach kostnych akrylowych można zmieniać ich właściwości fizyczne, mechaniczne oraz biologiczne. Wyniki naszych badań wskazują, że optymalny skład chemiczny cementu kompozytowego zawiera 1,5% mas. nanosrebra oraz 5%

mas. bioaktywnego szkła. Tak modyfikowany cement kostny posiadał właściwości antybakteryjne względem gronkowca złocistego, gronkowca skórniego, paciorkowca kałowego, pałeczki jelitowej *Enterobacter cloacae* czy pałeczki ropy błękitnej oraz poprawiał jakość i szybkość osteointegracji co może decydować o powodzeniu procesu implantacji. Dodatkowo, stopniowa degradacja tak przygotowanego cementu umożliwia stabilne uwalnianie antybakteryjnego nanosrebra, zapewniając dłuższą ochronę przeciwbakteryjną oraz zapewnia bezpieczeństwo stosowania implantów zawierających nanosrebro u pacjentów.

Publikacja:

Wekwejt M, Chen S, Kaczmarek-Szczepańska B, Nadolska M, Łukowicz K, Pałubicka A, **Michno A**, Osyczka AM, Michálek M, Zieliński A. Nanosilver-loaded PMMA bone cement doped with different bioactive glasses - evaluation of cytocompatibility, antibacterial activity, and mechanical properties. *Biomater Sci.* 2021 Apr 21;9(8):3112-3126.

6. Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową albo artystyczną realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury, w szczególności zagranicznej

W latach 2007-2021 współpracowałam z następującymi ośrodkami:

- Hull-York Medical Scholl, Hull University, Hull, UK;

W efekcie tej współpracy powstały następujące publikacje:

Green VL, Michno A, Greenman J, Stafford ND. Effect of treatment on systemic cytokines in head and neck squamous cell carcinoma patients. *Results Immunol.* 2011 Dec 17;2:1-6.

Green VL, Michno A, Stafford ND, Greenman J. Increased prevalence of tumour infiltrating immune cells in oropharyngeal tumours in comparison to other subsites: relationship to peripheral immunity. *Cancer Immunol Immunother.* 2013 May;62(5):863-73.

W ramach tej współpracy przebywałam na stażu naukowym podoktorskim.

- University of Bradford, Biomedical Sciences, Bradford University, Bradford, UK;

W efekcie tej współpracy powstały następujące publikacje:

Roberts W, Michno A, Aburima A, Naseem KM. Nitric oxide inhibits von Willebrand factor-mediated platelet adhesion and spreading through regulation of integrin alpha(IIb)beta(3) and myosin light chain. *J Thromb Haemost.* 2009 Dec;7(12):2106-15.

W ramach tej współpracy przebywałam na stażu naukowym podoktorskim.

Udział w grantach jako postdoctoral fellow:

- „*Prostacycline regulates thrombus formation in in vitro studies*” Bradford University, Department of Biomedical Sciences, Bradford, UK i Hull Your Medical School, Hull, UK pod kierunkiem prof. Khalid Naseem w latach 2007-2009, grant Heart Research UK;

Wyniki badań dotyczących działania prostacykliny na zależną od kolagenu aktywację płytek krwi i tworzenie skrzepu dostarczyły nowych informacji na temat mechanizmu działania prostacykliny i mogą mieć istotne znaczenie dla projektowania nowych substancji leczniczych o działaniu antyagregacyjnym i przeciwskrzepowym.

- „*Prevalence of tumour infiltrating immune cells in in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma*” Hull Your Medical School, Hull, UK pod kierunkiem prof. John Greenman w latach 2009-2011, grant Yorkshire Cancer Research, UK;

Wyniki badań dotyczących oceny zarówno populacji limfocytów regulatorowych, jak i efektorowych we krwi obwodowej pacjentów z rakiem płaskonabłonkowym głowy i szyi (HNSCC) w różnym stopniu zaawansowania i lokalizacji guza mogą mieć znaczenie w ustaleniu biomarkerów prognostycznych w tej lokalizacji guza.

1. Algocells, Regenexx, UK, klinika leczenia bólu i regeneracji. W efekcie powstała praca:

- Michno A, Kirkor Z, Gojtowska E, Suchorzewski M, Śmietańska I, Baścik B. 2020, Pulsed Radiofrequency Neuromodulation Contributes to Activation of Platelet-Rich Plasma in In Vitro Conditions. *Neuromodulation*;Feb 6. doi: 10.1111/ner.13105.

2. Politechnika Gdańska, Wydział Inżynierii Mechanicznej i Okrętownictwa, Instytut Technologii Maszyn i Materiałów, Zakład Technologii Biomateriałów.

W efekcie tej współpracy powstały następujące publikacje oraz zostałam promotorem pomocniczym mgr inż. Marcina Wekwejtę:

- Wekwejt M, Chen S, Kaczmarek-Szczepańska B, Nadolska M, Łukowicz K, Pałubicka A, Michno A, Osyczka AM, Michálek M, Zieliński A. Nanosilver-loaded PMMA bone cement doped with different bioactive glasses - evaluation of cytocompatibility, antibacterial activity, and mechanical properties. *Biomater Sci.* 2021 Mar 11. doi: 10.1039/d1bm00079a. Epub ahead of print. PMID: 33704333.
- Wekwejt M, Michno A., Truchan K, Pałubicka A, Świeczko-Żurek B, Osyczka AM, Zieliński A. 2019, Antibacterial Activity and Cytocompatibility of Bone Cement Enriched with Antibiotic, Nanosilver, and Nanocopper for Bone Regeneration. *Nanomaterials (Basel)*; 3;9(8):1114.

6. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę lub sztukę.

1. Udział w kształceniu studentów na kierunku lekarskim, prowadzenie seminariów i ćwiczeń z Diagnostyki Laboratoryjnej, III i V rok, od 2001-2016 roku, III rok od 2001, współautor seminariów, prezentacji multimedialnych;
2. Udział w kształceniu studentów na kierunku lekarskim, English Division prowadzenie seminariów i ćwiczeń z Diagnostyki Laboratoryjnej, III i V rok od 2006-2016 roku, III rok od 2006, współautor seminariów, prezentacji multimedialnych;
3. Udział w kształceniu studentów na kierunku analityka medyczna, prowadzenie seminariów i ćwiczeń z Diagnostyki Laboratoryjnej, I i II rok, od 2006 roku, współautor seminariów, prezentacji multimedialnych;
4. Udział w kształceniu studentów na kierunku dietetyka, prowadzenie seminariów i ćwiczeń z Diagnostyki Laboratoryjnej, I i II rok, studia stacjonarne i niestacjonarne od 2011 roku, współautor seminariów, prezentacji multimedialnych
5. Udział w kształceniu studentów na kierunku ratownictwo medyczne, prowadzenie seminariów i ćwiczeń z Diagnostyki Laboratoryjnej, I i II rok od 2011-2018 roku, współautor seminariów, prezentacji multimedialnych;
6. Udział w kształceniu specjalizacyjnym dla diagnostów laboratoryjnych, prowadzenie wykładów, seminariów i ćwiczeń z zaburzeń funkcji nerek, gospodarki wodno-elektrolitowej i zaburzeń hemostazy, od 2016 roku;

7. Udział w kształceniu specjalizacyjnym dla lekarzy medycyny rodzinnej, prowadzenie wykładów z diagnostyki zaburzeń hematologicznych i genetycznie uwarunkowanych w latach 2014-2016;
8. Współautor skryptu „Diagnostyka Laboratoryjna” dla studentów kierunku lekarskiego, Wydziału Lekarskiego, 2018 rok;
9. Nagroda Dydaktyczna Zespołowa II-go Stopnia przyznana przez Rektora Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego za opracowanie skryptu „Diagnostyka Laboratoryjna”, 2018;
10. Przygotowanie i udział w Medycznym Dniu Nauki, w 2017, 2018 i 2019 rok;
11. Opiekun koła naukowego, Medlab z Diagnostyki Laboratoryjnej od 2016 roku;

W ramach projektu SKN, członek koła Krzysztof Szaluś, student V roku kierunku lekarskiego GUMed otrzymał pierwszą nagrodę za najlepszą pracę eksperymentalną zatytułowaną: „Udział płytek krwi w regeneracji fibroblastów poddanych promieniowaniu UV w warunkach *in vitro*”, w ramach Zjazdu Sekcji Forum Młodych Polskiego Towarzystwa Dermatologicznego, w październiku 2019 roku w Łodzi oraz uzyskał grant podróżny na konferencję EADV – European Academy of Dermatology and Venereology w Wiedniu, we wrześniu 2020 roku.

12. Promotor pomocniczy pracy doktorskiej: Katarzyny Gruzewskiej, Rola związków wanadu w regulacji funkcji płytek krwi u pacjentów z cukrzycą, Wydział Lekarski, Gdański Uniwersytet Medyczny, 2012-2018;

Zakończony doktorat został zgłoszony przez recenzentów do wyróżnienia. Doktorantka została również wyróżniona drugą nagrodą za najlepszą prezentację ustną w ramach konferencji: 22nd International Student Scientific Conference for Students and Young Doctors, Gdańsk, Poland, April 2014. Tytuł prezentacji: „*Role of vanadium in in regulation of blood platelet activity*”.

13. Promotor pomocniczy pracy doktorskiej: Marcina Wekwejta, Modyfikacja cementu kostnego w celu uzyskania długotrwałej ochrony antybakteryjnej, Politechnika Gdańska, Wydział Inżynierii Mechanicznej i Okrętownictwa, Instytut Technologii Maszyn i Materiałów Zakład Technologii Biomateriałów, od 2018;
14. Opiekun 7 prac magisterskich w latach 2012-2020; studentów Analityki Medycznej, Wydziału Farmaceutycznego GUMed.

Jedna z prac magisterskich nagrodzona w 2015 roku: I miejscem Wydziałowego Konkursu Prac Magisterskich na Wydziale Farmaceutycznym z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej dla mgr Anna Szylejko za pracę „Wpływ cyklicznego AMP na funkcje płytek krwi w cukrzycy”;

7. Inne informacje, ważne z jego punktu widzenia, dotyczące jego kariery zawodowej

Otrzymane nagrody i stypendia:

1. Grant podróży ufundowany przez European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (EFLM) na 21th EuroMedLab Congress in Paris, 2015;
2. Grant podróży ufundowany przez European Federation of Clinical Chemistry na 10th EFCC Continuous Postgraduate Course on Thrombophilia in Dubrovnik, Croatia, October 2010;
3. Grant podróży ufundowany przez Fundację Rozwoju diagnostyki Laboratoryjnej na 2nd EFCC-UEMS European Joint Congress - Laboratory Medicine at the clinical interface, in Dubrovnik Croatia, October, 2012.
4. Wyróżnienie za prezentację posterową: International Society of Thrombosis and Hemostasis International Symposium of Hemostasis and Thrombosis, Boston, USA, Award for Top Third Best Posters). Michno et al. Prostacyclin targets integrin-mediated platelet adhesion and spreading on collagen, July 2009;
5. Nagroda Rektora GUMed za pracę doktorską: Wpływ cukrzycy na metabolizm acetylo-CoA i funkcję płytek krwi, 2008;
6. Nagroda zespołowa Ministra Zdrowia za cykl publikacji dotyczących metabolizmu płytek krwi w cukrzycy, 2005;
7. Pierwsza nagroda za prezentację ustną w trakcie: 12th International Research Meeting for Young Scientists and Doctors, Gdańsk, 2004. Nagrodą był grant podróży na 3-miesięczne stypendium naukowe na University of Bradford, Faculty of Biomedical Sciences, Bradford, UK;
8. III miejsce za wykład "Ocena funkcji płytek krwi w monitorowaniu właściwości wybranych składników leków i suplementów diety w warunkach *in vitro*" który odbył się w Lublinie w kwietniu 2015 roku. Konkurs był organizowany pod patronatem Prezesa Krajowej Izby Diagnostów Laboratoryjnych, Prezesa Polskiego Towarzystwa Diagnostyki Laboratoryjnej oraz Stowarzyszenia na rzecz Leczenia Ciężkich Krwotoków Centrum Onkologii Ziemi Lubelskiej im. św. Jana z Dukli.
9. Członek Polskiego Towarzystwa Diagnostyki Laboratoryjnej,

Członek zarządu i Delegat Oddziału Gdańskiego Polskiego Towarzystwa Diagnostyki Laboratoryjnej;

10. Recenzent prac m.in. w: Nutrients IF= 6.706, Biomedicines IF=6.081, International Journal of Molecular Science 5.923, Journal of Pharmacy and Pharmacology IF=2.405, Environmental Toxicology and Pharmacology 2.084, Environmental Toxicology IF=2,649;

8. Oświadczenie

Oświadczam, że nie ubiegałam się uprzednio o nadanie stopnia doktora habilitowanego.

(podpis wnioskodawcy)