

# Recenzja w postępowaniu habilitacyjnym dr n. med. Anny Michno

---

## I. Dane biograficzne i osiągnięcia zawodowe

Dr Anna Michno uzyskała dyplom magistra farmacji na Wydziale Farmaceutycznym Akademii Medycznej w Gdańsku w 2001 roku. Stopień doktora nauk medycznych uzyskała w 2007 roku na Wydziale Lekarskim Akademii Medycznej w Gdańsku na podstawie pracy pt. „Wpływ cukrzycy na różne drogi metabolizmu acetylo-CoA i funkcje krwinek płytkowych”. Promotorem w przewodzie był prof. dr hab. Andrzej Szutowicz.

Dr Anna Michno pracuje w Zakładzie Medycyny Laboratoryjnej Katedry Biochemii Klinicznej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, gdzie w latach 2003-2011 była zatrudniona na stanowisku asystenta, a od 2011 roku do teraz – na stanowisku adiunkta. W latach 2007-2009 pracowała dodatkowo jako asystent naukowy w Uniwersytecie Bradford w Wielkiej Brytanii, a w latach 2009-2011 jako asystent naukowy w Uniwersytecie Hull w Wielkiej Brytanii.

## II. Ocena „osiągnięcia naukowego”

Przedstawionym do oceny „osiągnięciem naukowym” jest cykl 5 publikacji objętych wspólnym tytułem „Ocena stanu aktywacji płytek krwi jako użyteczny marker w medycynie regeneracyjnej i ocenie ryzyka powikłań hemostatycznych.” Artykuły zostały opublikowane w latach 2009-2022 w recenzowanych czasopismach naukowych o współczynniku oddziaływania (IF) mieszczącym się w zakresie 3,027 - 6,706. Łączny IF wynosi 24,848, a liczba punktów MNiSW – 472. Wszystkie prace mają charakter oryginalny. W trzech z nich dr Anna Michno jest pierwszą autorką, w pozostałych dwóch – drugą autorką.

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. Biorą też one udział w procesach stanu zapalnego, wydzielając z ziarnistości szereg czynników sygnalizacyjnych charakterystycznych dla komórek układu odpornościowego takich jak cytokiny, czynniki wzrostu, peptydy przeciwbakteryjne, aminy biogenne.

Warunkiem prawidłowej funkcji płytek krwi jest ich aktywacja, która zachodzi dzięki wiązaniu glikoprotein błonowych ze składnikami macierzy podśródbłonkowej, takimi jak kolagen. W konsekwencji dochodzi do zmiany kształtu płytek i uwolnienia do przestrzeni pozapłytkowej licznych substancji zgromadzonych w ich ziarnistościach takich jak ADP, ATP, jony wapnia i magnezu, serotonina, fibrynogen, fibronektyna, czynnik płytkowy 4, czynnik von Willebranda (VWF), trombospondyna, płytkopochodny czynnik wzrostu, białko S, czynnik V czy czynnik VIII. Ponadto uwalniane są czynniki sygnalizacyjne charakterystyczne dla komórek układu odpornościowego: cytokiny, czynniki wzrostu, peptydy przeciwbakteryjne, aminy biogenne. Upośledzona aktywacja płytek krwi może być przyczyną skazy krwotocznej, podczas gdy ich nadmierna aktywacja może zwiększać podatność pacjentów na incydenty zakrzepowe. Aktywacja płytek krwi jest więc procesem kluczowym dla zapewnienia hemostazy, a jej zaburzenia mogą być przyczyną zagrażających zdrowiu i życiu stanów. Aktywowane płytki krwi mogą być też jednak wykorzystane do celów medycyny regeneracyjnej, czego przykładem są próby zastosowania autologicznego osocza bogatopłytkowego (PRP). Wszystkie publikacje przedstawione w cyklu jako „osiągnięcie naukowe” dotyczą tematyki aktywacji płytek krwi. 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.

Cykl otwiera praca opublikowana w *Neuromodulation* w 2021 roku (IF=4,722). Celem badania była weryfikacja hipotezy, że połączenie dwóch technik leczenia bólu, wstrzyknięć 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. Osoczowe koncentraty płytek krwi eksponowano na przerywane, szybkie impulsy elektryczne. Wykazano, że takie oddziaływanie sprzyja aktywacji płytek, co oceniano badając uwalnianie czynnika płytkowego 4 i ATP. Ilość tych substancji była dwukrotnie większa w porównaniu z koncentratami nie eksponowanymi na PRF. PRF zwiększała wydzielanie ziarnistości płytkowych w stopniu podobnym do tego jaki obserwuje się po aktywacji trombiną. Nie miała wpływu na metabolizm i integralność strukturalną płytek krwi. A zatem użycie PRF łącznie z miejscowym podaniem preparatów PRP w medycynie regeneracyjnej umożliwiłoby pełną aktywację płytek krwi i efektywne wydzielanie płytkopochodnych czynników wzrostu bez konieczności stosowania egzogennych aktywatorów płytek krwi.

W drugiej pracy, opublikowanej w *Pharmacol Rep* w 2020 roku (IF=3,027), weryfikowano hipotezę zakładającą, że zmiany metabolizmu płytek krwi w przebiegu cukrzycy typu 2 prowadzą do ich hiperaktywacji. Wykazano, że agregacja spontaniczna oraz agregacja indukowana trombiną płytek krwi u pacjentów z cukrzycą była większa w porównaniu do osób zdrowych. Większa była też akumulacja płytkowych reaktywnych związków reagujących z kwasem tiobarbiturowym, a także ilość uwalnianego ATP oraz ekspresja podjednostki E2 PDHc (transacetylazy dihydrolipoilu) i aktywność dehydrogenazy pirogronianowej płytek krwi. A zatem hiperglikemia w cukrzycy jest czynnikiem aktywującym płytki krwi i może

zwiększać ryzyko powikłań zakrzepowych. Selektywna inhibicja PDHc-E2 może być potencjalnie korzystna w zapobieganiu hiperaktywacji płytek krwi u chorych na cukrzycę typu 2.

Trzecia praca cyklu została opublikowana w *Nutrients* w 2022 roku (IF=6,706). Jej celem 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. Rezweratrol jest rodzajem naturalnego, roślinnego związku polifenolowego. Ma działanie przeciwutleniające, neuroprotekcyjne, przeciwnowotworowe, rozszerzające naczynia krwionośne, ochronne na chrząstkę stawową, kardioprotekcyjne i przeciwplatekcyjne. Wykazuje też właściwości hipoglikemizujące i przeciwzapalne. W pracy wykazano, że 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. Zgodnie z założoną hipotezą wykazano też, że rezweratrol blokuje 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. Rezweratrol silniej blokuje aktywację i metabolizm krwinek płytkowych w warunkach hiperglikemii. Może mieć więc potencjalnie korzystne działanie przeciwplatekcyjne w hiperglikemii u pacjentów z cukrzycą typu 2.

W czwartej pracy, opublikowanej w *Nanomaterials (Basel)* w 2019 roku (IF=4,324), w której dr Anna Michno jest drugą autorką, badano wpływ modyfikowanych cementów kostnych na bazie polimetakrylanu metylu (PMMA) na elementy morfotyczne krwi. Cementy te są wykorzystywane w zabiegach endoprotezoplastyki, w leczeniu zmian zwyrodnieniowych stawów oraz w traumatologii narządu ruchu. Wykazano, że cementy kostne PMMA, oraz PMMA wzbogacone gentamycyną, nanocząstkami Ag i nanocząstkami Cu nie mają wpływu na agregację spontaniczną płytek krwi w warunkach in vitro. 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. Z kolei cement kostny PMMA z gentamycyną istotnie redukował aktywację i agregację płytek krwi, co mogłoby wiązać się z ryzykiem krwawienia pooperacyjnego. PMMA wzbogacony nanocząstkami Cu istotnie redukował zarówno agregację jak i przeżywalność płytek krwi. Taka postać cementu kostnego może być więc bardziej toksyczna dla płytek krwi niż inne cementy PMMA i stwarzać większe ryzyko powikłań krwotocznych.

Przedmiotem piątej pracy opublikowanej w *J Thromb Haemost* w 2009 roku (IF=6,069), w której dr Anna Michno jest drugą autorką, było określenie mechanizmów działania tlenku azotu (NO) na zależną od VWF aktywację płytek krwi w tym: adhezję, zmianę kształtu i ich agregację. Badania przeprowadzono w międzynarodowym zespole Uniwersytetu Bradford. Wykazano, że NO hamuje wczesną aktywację płytek krwi poprzez redukcję fosforylacji lekkiego łańcucha miozyny (MLC) zarówno poprzez blokowanie integryny  $\alpha$ IIb $\beta$ 3, która jest

wymagana do maksymalnej fosforylacji MLC, jak i poprzez aktywację fosfatazy MLC. NO redukuje też rekrutację płytek krwi, ich agregację i zmianę kształtu, ale nie ma wpływu na adhezję płytek krwi aktywowanych przez VWF. NO może ponadto redukować tworzenie skrzepu poprzez hamowanie agregacji płytek krwi, przy jednoczesnym zachowaniu zdolności płytek krwi do adhezji. Stabilne analogii tlenku azotu mogą mieć więc potencjalnie korzystne działanie przeciwplatek, przy jednoczesnym mniejszym ryzyku powikłań krwotocznych

Płytki krwi odgrywają istotną rolę nie tylko w zapewnieniu hemostazy, ale też modulacji stanów zapalnych i procesów gojenia. Zaburzenia funkcji płytek krwi mogą mieć istotny wpływ na stan zdrowia, co jest przedmiotem zainteresowania wielu dziedzin medycyny. Dokładne poznanie mechanizmów wpływających na ich aktywację jest podstawą do opracowania interwencji terapeutycznych m.in. w leczeniu chorób metabolicznych, ortopedii, czy medycynie regeneracyjnej. Podjęcie przez dr Annę Michno badań w tym obszarze jest więc w pełni uzasadnione. Postawiła ona w swoich pracach odpowiednie hipotezy, a następnie właściwie zaplanowała i zrealizowała ich weryfikację w warunkach doświadczalnych. Wybór nowoczesnych metod badawczych był adekwatny, a wyciągane wnioski uzasadnione wynikami. Publikacje przedstawione jako „osiągnięcie naukowe” cechują się bardzo dużą spójnością i mogą przyczynić się do dalszego rozwoju badań w danym obszarze wiedzy. Cykl spełnia wymogi stawiane „osiągnięciom naukowym” dla kandydatów do stopnia doktora habilitowanego.

### III. Ocena „istotnej aktywności naukowej”

Zgodnie z analizą bibliometryczną przeprowadzoną przez Pracownię Bibliograficzną Biblioteki Głównej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego dr Anna Michno, poza publikacjami przedstawionymi jako „osiągnięcie naukowe” jest autorką 13 prac, spośród których 10 to prace oryginalne, 2 to prace poglądowe, a jedna jest rozdziałem w monografii. Pięć prac zostało opublikowanych przed uzyskaniem stopnia doktora, a osiem – po uzyskaniu stopnia doktora. W trzech publikacjach dr Anna Michno jest pierwszą autorką, w pięciu – drugą autorką, a w jednej – trzecią autorką.

Łączny wskaźnik oddziaływania publikacji („impact factor”) wynosi 51,884 (76,708 z uwzględnieniem prac przedstawionych jako „osiągnięcie naukowe”). Łączny IF prac z pierwszym autorstwem to 18,121 (32,576 z uwzględnieniem prac wykazanych jako „osiągnięcie naukowe”). Uzupełnieniem dorobku są 24 doniesienia zjazdowe, w tym 10 zagranicznych.

Łączna liczba cytowań wg bazy Web of Science wynosi 297 (284 z wyłączeniem autocytowań), a wartość indeksu Hirscha – 8.

W okresie po uzyskaniu stopnia doktora do najistotniejszych, w moim przekonaniu, dokonań naukowych dr Anny Michno należą badania dotyczące oceny odpowiedzi immunologicznej w

raku płaskonabłonkowym głowy i szyi (HNSCC), realizowane we współpracy z zespołem Hull-York Medical School, Hull University w Wielkiej Brytanii. W ramach tych badań analizowano subpopulacje limfocytów naciekających guz (TIL), subpopulacje limfocytów we krwi obwodowej oraz profil cytokin typu Th1 i Th2. Wykazano m.in. zwiększoną ilość TIL o fenotypie CD4+ i FOXP3+ w tkance nowotworu części krtaniowej gardła, w porównaniu do innych lokalizacji HNSCC, w tym krtani. 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). 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 $\alpha$  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. Wyniki tych istotnych z punktu widzenia patofizjologii nowotworów prac przedstawiono w dwóch publikacjach, w których dr Anna Michno była drugą autorką.

Dr Anna Michno uczestniczyła w badaniach dotyczących toksyczności jonów cynku i wanadu. Oceniano wpływ jonów cynku na metabolizm N-acetyloasparagianu (NAA) w tym aktywność neuronalnej N-acetylotransferazy (NAT8L) w neuronalnych komórkach cholinergicznym. Po raz pierwszy wykazano, że mitochondria komórek cholinergicznym zawierają 85-90% całkowitej puli NAA i NAT8L. Potwierdzono, że zarówno krótko-, jak i długoterminowa inkubacja tych komórek w obecności 0.15mM Zn<sup>2+</sup> prowadzi do spadku zawartości mitochondrialnego asparagianu i acetoocetanu oraz NAA. Ponadto Zn<sup>2+</sup> hamuje aktywność NAT8L. Zaobserwowano, że hodowla komórek neuronalnych SN56 zróżnicowanych do fenotypu cholinergicznym, w środowisku o niskiej zawartości tiaminy, nie prowadzi ani do spadku ich liczby ani nie wpływa na integralność metaboliczną komórek. Z drugiej strony w takich warunkach niskie, 0.10 mmol/L stężenia Zn ujawniają silne działanie cytotoksyczne wynikające z jego nadmiernej akumulacji w komórkach. 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. Wykazano również, że komórki astrogleju, zarówno pierwotne, jak i linii C6 charakteryzują się znacznie mniejszą wrażliwością na bodźce neurotoksyczne niż neurony. Powyższe wyniki przedstawiono w cyklu czterech publikacji ze współautorstwem dr Anna Michno.

Dr Anna Michno jest też współautorką pracy dotyczącej oceny skuteczności antybakteryjnej, biogodności i bezpieczeństwa cementów akrylowych wzbogaconych bioaktywnym szkłem. Modyfikacja ta ma na celu uzyskanie zmiennej w czasie porowatości umożliwiającej stopniowe uwalnianie z cementu substancji aktywnych takich jak nanocząstki srebra. Wykazano, że w zależności od rodzaju i stężenia zastosowanych modyfikatorów w cementach kostnych akrylowych można zmieniać ich właściwości fizyczne, mechaniczne oraz biologiczne. Wyniki badań pozwoliły na ustalenie optymalnego składu chemicznego cementu kompozytowego.

Całość dorobku naukowego dr Anny Michno wskazuje na umiejętność samodzielnego kreowania jak i realizacji projektów naukowych o dużej wartości poznawczej, wykraczających poza zespół badawczy w miejscu zatrudnienia. Daje obraz samodzielnego naukowca o bardzo dużym potencjale i pozwala mieć nadzieję na szybki dalszy rozwój.

#### IV. Inne aktywności i osiągnięcia

Dr Anna Michno od 2001 roku prowadzi działalność dydaktyczną. Obejmuje ona prowadzenie seminariów i ćwiczeń z diagnostyki laboratoryjnej dla studentów polskich i anglojęzycznych. Bierze udział w kształceniu specjalizacyjnym dla diagnostów laboratoryjnych oraz lekarzy medycyny rodzinnej. Działalność ta polega na prowadzeniu wykładów, seminariów i ćwiczeń. Jest współautorką skryptu „Diagnostyka Laboratoryjna” dla studentów kierunku lekarskiego oraz opiekunką koła naukowego Medlab z Diagnostyki Laboratoryjnej. Była promotorem pomocniczym w dwóch przewodach doktorskich oraz opiekunem siedmiu prac magisterskich. W 2008 roku została wyróżniona nagrodą Rektora Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego za pracę doktorską, a w 2005 roku – nagrodą zespołową Ministra Zdrowia za cykl publikacji dotyczących metabolizmu płytek krwi w cukrzycy. Jest członkiem zarządu Oddziału Gdańskiego Polskiego Towarzystwa Diagnostyki Laboratoryjnej oraz recenzentką prac w sześciu międzynarodowych czasopismach naukowych.

#### V. Wniosek końcowy

Po szczegółowym przeanalizowaniu dorobku naukowego stwierdzam, że prace dr n. med. Anny Michno stanowią jej cenny samodzielny dorobek. Reprezentują wysoki poziom naukowy, a uzyskane wyniki badań wnoszą nowe wartości, stanowiące znaczący wkład w rozwój reprezentowanych dziedzin. Zarówno cykl prac przedstawiony jako „osiągnięcie naukowe” jak i całość aktywności naukowej dr n. med. Anny Michno spełniają kryteria wymagane w postępowaniu habilitacyjnym zgodnie z zapisami art. 219 Ustawy Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce z dnia 20 lipca 2018r. Z pełnym przekonaniem zwracam się do Rady Nauk Medycznych Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie dr Anny Michno do dalszych etapów postępowania.

Prof. dr hab. Sebastian Giebel

Narodowy Instytut Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie, Państwowy Instytut Badawczy,  
Oddział w Gliwicach