



**Autoreferat
przedstawiający opis kariery zawodowej
oraz aktywności naukowej**

Załącznik nr 3

Białystok 2022

1. Tomasz Misztal

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe – z podaniem podmiotu nadającego stopień, roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej:

- *Dyplom magistra biologii w specjalizacji biochemia* uzyskany na kierunku Biologia 25 czerwca 2009 r. na podstawie obronionej pracy magisterskiej pt. „Identyfikacja proteaz uczestniczących w odpowiedzi *Abortiporus biennis* i *Trametes versicolor* na stres oksydacyjny metodą natywnej elektroforezy żelowej” w Zakładzie Biochemii Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie
- *Dyplom doktora nauk medycznych w dyscyplinie biologia medyczna* uzyskany w dniu 26 czerwca 2014 r. decyzją Rady Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku na podstawie przedłożonej rozprawy doktorskiej pt.: “Wpływ reaktywnych form azotu na proces retrakcji skrzepu i fibrylizację” oraz po złożeniu wymaganych egzaminów (Promotor: prof. dr hab. Marian Tomasiak; Recenzenci: dr hab. Joanna Matowicka-Karna, prof. dr hab. Ewa Żekanowska)

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych:

od 01.10.2009 r.

Zakład Chemii Fizycznej Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku – jako asystent naukowo-dydaktyczny. Od 01.10.2016 r. jako adiunkt badawczo-dydaktyczny

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

4a) tytuł osiągnięcia naukowego:

„Reaktywne produkty stanu zapalnego – kwas chlorowy (I) i nadtlenoazotyn – jako modulatory hemostazy. Badania nad mechanizmem oddziaływania i kontrolą efektu”

4b) uzyskane osiągnięcie naukowe wynikające z art. 219 ust. 1 pkt. 2 Ustawy:

Osiągnięcie naukowe stanowi cykl powiązanych tematycznie 4 oryginalnych artykułów naukowych [H.1-H.4], opublikowany w latach 2014-2022, o sumarycznym współczynniku oddziaływania *Impact Factor* (IF) wynoszącym **22,605** i łącznej wartości punktacji Ministerstwa Edukacji i Nauki (MEiN) wynoszącej **305 (450*)**. *punktacja MEiN zgodna z listą z 2021 r.

[H.1]

Misztal Tomasz, Rusak Tomasz, Tomasiak Marian. Clinically relevant HOCl concentrations reduce clot retraction rate via the inhibition of energy production in platelet mitochondria. *Free Radical Research*. 2014; 48(12): 1443-1453.

Impact Factor: 2,976 ; MEiN: 25 (70*), cytowania wg Web of Science: 8

Mój wkład: opracowanie koncepcji badań, wykonanie części oznaczeń (synteza nadtlenoazotynu, preparatyka płytek krwi, pomiary kinetyki retrakcji skrzepu, pomiary kinetyki krzepnięcia we krwi pełnej, pomiary adhezji płytek krwi, ocena integralności błony plazmatycznej płytek, ocena stopnia polimeryzacji aktyny w płytkach, pomiary sygnału wapniowego w aktywowanych płytkach ocena metabolizmu energetycznego – produkcji mleczanu i poboru tlenu przez płytki krwi, pomiar ilości ATP w płytkach, pomiar mitochondrialnego potencjału błonowego), opracowanie wyników, dyskusja wyników, przygotowanie i edycja manuskryptu, udział w odpowiedzi na recenzje.

[H.2]

Misztal Tomasz, Rusak Tomasz, Brańska-Januszewska Justyna, Ostrowska Halina, Tomasiak Marian. Peroxynitrite may affect fibrinolysis via the reduction of platelet-related fibrinolysis resistance and alteration of clot structure. *Free Radical Biology and Medicine*. 2015; 89; 533-547.

Impact Factor: 5,784; MEiN: 40 (140*), cytowania wg Web of Science: 13

Mój wkład: opracowanie koncepcji badań, implementacja i optymalizacja technik badawczych (ocena architektury skrzepu fibrynowego i fibrynowo-płytkowego w mikroskopie konfokalnym), wykonanie części oznaczeń (synteza nadtlenoazotynu, preparatyka płytek krwi, oczyszczanie i znakowanie fluoroforem laktadheryny wołowej, pomiary adhezji płytek, pomiary kinetyki retrakcji skrzepu, ocena fibrynolizy w skrzepach ubogo- i bogatopłytkowych, pomiary kinetyki krzepnięcia we krwi pełnej, pomiary aktywności czynników fibrynolitycznych techniką zymografii żelowej, cytometryczne oznaczanie zrzucania mikropęcherzyków z płytek krwi oraz ekspresji fosfatydyloseryny na aktywowanych płytkach, ocena architektury skrzepu metodą mikroskopii konfokalnej), opracowanie wyników, analiza statystyczna, dyskusja wyników, przygotowanie i edycja manuskryptu, udział w odpowiedzi na recenzje

[H.3]

Misztal Tomasz, Gołaszewska Agata, Tomasiak-Łozowska Maria Magdalena, Iwanicka Marta, Marcińczyk Natalia, Leszczyńska Agnieszka, Chabielska Ewa, Rusak Tomasz. The myeloperoxidase product, hypochlorous acid, reduces thrombus formation under flow and attenuates clot retraction and fibrinolysis in human blood. *Free Radical Biology and Medicine*. 2019; 141; 426-437.

Impact Factor: 6,170; MEiN: 140, cytowania wg Web of Science: 13

Mój wkład: opracowanie koncepcji badań, implementacja i optymalizacja technik badawczych (formowanie agregatów płytkowych na powierzchni trombogennej w warunkach przepływu, tzw. technika „flow chamber”), wykonanie części oznaczeń (pomiary kinetyki krzepnięcia i fibrynolizy we krwi pełnej, pomiary kinetyki retrakcji skrzepu, cytometryczne pomiary ekspresji P-selektyny i fosfatydyloseryny na powierzchni płytek krwi, ocena formowania agregatów płytkowych na powierzchni trombogennej w warunkach przepływu, ocena wiązania plazminogenu do fibryny w warunkach przepływu, jednoczesne pomiary agregacji i sekrecji z ziarnistości gęstych płytek

krwi, pomiary aktywności plazminy i czynnika XIII krzepnięcia), opracowanie wyników, analiza statystyczna, dyskusja wyników, przygotowanie i edycja manuskryptu, pełnienie roli autora korespondencyjnego, odpowiedź na recenzje

[H.4]

Misztal Tomasz, Gołaszewska Agata, Marcińczyk Natalia, Tomasiak-Łozowska Maria, Szymanowska Małgorzata, Chabielska Ewa, Rusak Tomasz. Natural polyphenols may normalize hypochlorous acid-evoked hemostatic abnormalities in human blood. *Antioxidants*. 2022: 11(4) 13 pp; Article ID 779.

Impact Factor: 7,675; MEiN: 100, cytowania wg Web of Science: 0

Mój wkład: opracowanie koncepcji badań, wykonanie części oznaczeń (część eksperymentów z pomiarem agregacji płytek krwi, formowanie agregatów płytkowych na powierzchni trombogennej w warunkach przepływu, ocena architektury skrzepu metodą mikroskopii konfokalnej, pomiar utleniania grup tiolowych w białkach osocza eksponowanych na HOCl, pomiary szybkości fibrynolizy w osoczu), opracowanie wyników, analiza statystyczna, dyskusja wyników, przygotowanie i edycja manuskryptu, pełnienie roli autora korespondencyjnego, odpowiedź na recenzje.

* punktacja MEiN zgodna z listą z 2021 r.

Kopie publikacji i oświadczenia wszystkich współautorów wskazujące na ich merytoryczny wkład w powstanie każdej pracy znajdują się w **Załączniku nr 5** dokumentacji.

4c) Omówienie celu badawczego w/w prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.

I. Wprowadzenie

Od początku mojej kariery zawodowej, moje zainteresowania naukowe dotyczyły wpływu niskocząsteczkowych, wysoce reaktywnych produktów stanu zapalnego – takich jak reaktywne formy tlenu, azotu czy chloru – na hemostazę.

Terminem „hemostaza” określa się szereg mechanizmów mających na celu zapobiegać utracie krwi w razie urazu, jednocześnie zapewniając utrzymanie ciągłości jej przepływu w naczyniach krwionośnych. Jednym z najważniejszych regulatorów hemostazy są płytki krwi – niewielkie, bezjądrzaste, pobudliwe elementy morfotyczne krwi. W fizjologicznych warunkach aktywację płytek krwi ograniczają komórki śródbłonna naczyń krwionośnych, które stale produkują substancje hamujące adhezję i agregację płytek. W wyniku uszkodzenia śródbłonna (uraz naczynia) odsłonięciu ulegają białka warstwy podśródbłonkowej będące stymulatorami płytek (np. kolagen czy czynnik von Willebranda), a lokalne stężenie inhibitorów aktywacji płytek spada. Pod wpływem kontaktu z białkami warstwy podśródbłonkowej płytki krwi ulegają aktywacji, co przejawia się zmianą ich kształtu z dyskoidalnego na sferyczny z licznymi wypustkami. Tak aktywowane płytki przylegają (adhezja) do miejsca uszkodzenia naczynia, a następnie zlepiają się z sobą (agregacja) prowadząc do powstania czopu płytkowego, który wstępnie hamuje wypływ krwi z uszkodzonego naczynia [1]. Dodatkowo, płytki uwalniają szereg substancji, które biorą udział w aktywacji kolejnych płytek napływających z prądem krwi (sekrecja) oraz amplifikują reakcje enzymatyczne skutkujące koagulacją (krzepnięciem) krwi. Zdolność płytek krwi do nasilania procesu krzepnięcia nosi nazwę „odpowiedzi prokoagulacyjnej” i opiera się na ekspozycji na powierzchni błony aktywowanych płytek ujemnie naładowanych fosfolipidów (głównie fosfatydyloseryny i fosfatydyloetanolaminy), które stanowią powierzchnię katalityczną, na której zachodzi aktywacja osoczowych czynników krzepnięcia. Fosfolipidy te wykazują zdolność do immobilizacji kompleksów złożonych z czynników krzepnięcia: VIIIa-IXa (tzw. kompleks tenazy) i Va-Xa (zwany kompleksem protrombinazy). W efekcie dochodzi do generacji znacznej ilości trombiny przekształcającej

rozpuszczony w osoczu fibrynogen we włóknistą sieć fibryny, która stabilizuje powstały wcześniej czop płytkowy (noszący od teraz nazwę fibrynowo-płytkowego [2,3]. Pomiar kinetyczne wskazują, że proces krzepnięcia zachodzi co najmniej 100 tysięcy razy szybciej na powierzchni aktywowanych płytek krwi niż w fazie płynnej osocza [4,5]. Szybka (odbywająca się w ciągu sekund) aktywacja płytek krwi umożliwia lokalizację procesu krzepnięcia tylko do miejsca uszkodzenia naczynia, co przyczynia się do zatrzymania krwawienia bez rozsiewania się procesu krzepnięcia poza miejsce jego inicjacji. Powstający w świetle naczynia zakrzep może jednak znacząco utrudniać przepływ krwi prowadząc do niedotlenienia tkanek – hipoksji. Takiej sytuacji zapobiegają obecne w czopie fibrynowo-płytkowym płytki krwi, które poprzez generowanie siły kurczliwej – następnie przekazywanej na włókna fibryny oraz sąsiednie płytki – prowadzą w rezultacie do retrakcji (obkurczenia) skrzepu. Obliczenia bazujące na równaniu Poiseuille'a pozwalają stwierdzić, że zmniejszenie objętości czopu fibrynowo-płytkowego zaledwie o 8% przywraca przepływ krwi w tak częściowo udrożnionym naczyniu aż w 30% [6]. Retrakcja skrzepu ma kluczowe znaczenie w jego stabilizacji, zapobiegając oderwaniu go przez płynącą krew, co mogłoby skutkować tak krwawieniem, jak i embolizacją (zaczopowaniem) naczynia [7]. Jednocześnie, efektywna retrakcja skrzepu minimalizuje ryzyko wystąpienia burzliwego przepływu krwi i wysokich wartości naprężeń ścinających (ang. *shear stress*), które mogą prowadzić do spontanicznej aktywacji kolejnych płytek napływających wraz ze strumieniem krwi (tzw. *Shear-Induced Platelet Aggregation, SIPA*) [8,9], zwiększając ryzyko wystąpienia zawału mięśnia sercowego, udaru niedokrwienego mózgu czy zakrzepicy żył głębokich. Zaburzenia retrakcji skrzepu będą zatem stwarzały ryzyko zatorowo-zakrzepowe.

Istnieje ścisła relacja pomiędzy procesem retrakcji skrzepu, a fibrynolizą (enzymatycznym rozpuszczeniem skrzepu). Najnowsze badania wskazują, że wydajny przebieg procesu retrakcji skutkuje nie tylko częściowym udrożnieniem naczynia, ale także spowalnia szybkość lizy skrzepu „od zewnątrz” poprzez utrudnienie wiązania i wnikania osoczowych czynników fibrynolitycznych w strukturę zakrzepu. Jednocześnie, wewnątrz obkurzonego skrzepu dochodzi do szybszej inicjacji fibrynolizy ze względu na silne zagęszczenie (a zatem wysokie lokalne stężenie) fibryny, katalizującej aktywację inicjatorów fibrynolizy [10]. Zaburzona retrakcja (co może mieć miejsce w wyniku pojawienia się związków hamujących metabolizm energetyczny, np. reaktywnych form azotu [11-12]) będzie zatem pociągać za sobą

zmiany w przebiegu fibrynolizy. Ma to istotne znaczenie kliniczne, bowiem spowolniona retrakcja skrzepu koreluje ze wzrostem ryzyka epizodów zakrzepicy płucnej, w wyniku oderwania niewydajnie obkurzonego (przez to bardziej podatnego na oderwanie od ściany naczynia) skrzepu i embolizacji tętnicy płucnej [13,14]. Zwiększone ryzyko epizodów zakrzepowo-zatorowych i zahamowaną fibrynolizę obserwuje się w przebiegu chorób o zapalnym fenotypie, takich jak astma, cukrzyca czy reumatoidalne zapalenie stawów [15-17].

Badania kliniczne i laboratoryjne prowadzone w celu określenia związku pomiędzy hemostazą i stanem zapalnym dotychczas koncentrowały się przede wszystkim na mechanizmach długoterminowych, w które zaangażowane są cytokiny [18,19]. W kanonicznym ujęciu, stan zapalny wiąże się z nasileniem procesu koagulacji, na drodze ekspresji czynnika tkankowego (TF, *tissue factor*) przez aktywowane komórki stanu zapalnego i – zmienione w stanie zapalnym – komórki śródbłonka naczyń krwionośnych i w rezultacie aktywację ścieżki krzepnięcia inicjowanej pojawieniem się kompleksu TF-VIIa. Dochodzi także do zahamowania fibrynolizy poprzez zwiększone wydzielanie inhibitorów lizy, szczególnie PAI-1 [20]. W stanie zapalnym dochodzi też do zmian w obrębie śródbłonka naczyń, prowadzących do hamowania mechanizmów zapobiegających spontanicznej aktywacji płytek krwi. Są to jednak odpowiedzi „późne” wymagające ekspresji różnych genów, produkcji i wydzielania cytokin i zmian w fenotypie śródbłonka naczyń krwionośnych (endoteliopatii). Mechanizmy te zostały zidentyfikowane w różnych modelach doświadczalnych i relatywnie dobrze poznane. Znacznie mniej wiadomo o roli w patogenezie zaburzeń hemostazy w stanie zapalnym substancji produkowanych w celu zabicia patogenów, które mogą się pojawić w sąsiedztwie aktywowanych komórek immunologicznych w wysokich stężeniach, bezpośrednio po inicjacji stanu zapalnego, a ich produkcja ulegać dynamicznym zmianom. Do tej grupy związków należą reaktywne formy tlenu, chloru i azotu.

Wśród substancji produkowanych przez aktywowane komórki stanu zapalnego, które wykazują takie działanie szczególną rolę przypisuje się reaktywnym formom chloru i azotu (12,21,22). Reprezentantami tych grup związków są: kwas chlorowy (I) (HOCl) i nadtlenoazotyn (ONOO⁻).

Podczas stanu zapalnego aktywowane neutrofile wydzielają do środowiska zewnątrzkomórkowego (np. osocza krwi) enzym mieloperoksydazę (MPO, EC 1.11.2.2). Ta hemoproteina katalizuje powstawanie dużych ilości HOCl, w reakcji pomiędzy H₂O₂, a jonami chlorkowymi. Źródłem H₂O₂ jest tzw. „wybuch oddechowy” – proces, w którym aktywowany przez czynnik prozapalny neutrofil konsumuje znaczne ilości tlenu i dochodzi do generacji reaktywnych form tlenu, w tym H₂O₂ [23]. Produkcja HOCl przez aktywowane neutrofile może wynieść nawet kilkaset μM/h [24], zaś lokalne stężenie w niektórych tkankach może wynieść nawet kilka mM [25]. HOCl jest bardzo skuteczny w zabijaniu patogenów na drodze modyfikacji specyficznych reszt aminokwasowych w białkach bakterii [26], ale też zaburzeniu metabolizmu energetycznego [27]. Podwyższone stężenie MPO w osoczu zostało zidentyfikowane jako czynnik ryzyka zakrzepowo-zatorowego w takich chorobach jak: miażdżyca [28], reumatoidalne zapalenie stawów [29], zapalenie kłębuszków nerkowych [30] czy ciężka niewydolność nerek [31]. Brak jest jednak kompleksowych badań nad wpływem produktu MPO – HOCl, na poszczególne etapy hemostazy – aktywację płytek krwi, tworzenie skrzepu, jego retrakcję i fibrylizację. Badania, w których podjęto próbę oceny wpływu HOCl na wybrane aspekty hemostazy pozwoliły ustalić, że HOCl może utleniać (a przez to inaktywować) czynniki krzepnięcia takie jak fibrynogen, oraz czynniki V, VIII i X [32], a także hamować agregację króliczych płytek krwi [33]. Należy jednak zaznaczyć, że badania często były prowadzone na modelach o ograniczonej analogii do sytuacji *in vivo* (np. oczyszczonych preparatach białkowych) oraz używano bardzo wysokich stężeń HOCl (milimolarnych), mało prawdopodobnych do pojawienia się we krwi. W momencie podjęcia przeze mnie badań, brak było jakichkolwiek informacji o możliwym wpływie HOCl na retrakcję skrzepu. Co więcej, takie oddziaływanie wydaje się być prawdopodobne zważywszy na fakt, że retrakcja jest silnie powiązana z produkcją energii w komórkach, co może być zaburzone przez HOCl [22,27].

Drugi z badanych przeze mnie reaktywnych mediatorów stanu zapalnego to nadtlenoazotyn (ONOO⁻). Wytwarzany jest on z tlenku azotu (NO[•]) oraz anionorodnika ponadtlenkowego (O₂^{-•}) [21]. W wyniku pojawienia się patogenu, zaktywowane komórki stanu zapalnego produkują duże ilości reaktywnych form tlenu (w tym O₂^{-•}), głównie w wyniku aktywacji oksydazy NADPH (EC 1.6.3.1), a także wytwarzają NO[•] w wyniku ekspresji indukcyjnej formy tlenku azotu (iNOS) oraz nasilenia ekspresji śródbłonkowej izoformy syntazy

tlenku azotu (eNOS) (EC 1.14.13.39) [34]. Także $\text{NO}\cdot$ produkowany konstytutywnie przez komórki śródbłonna naczyń krwionośnych może brać udział w powstawaniu ONOO^- . *In vivo* reakcja pomiędzy NO i $\text{O}_2\cdot^-$ zachodzi bardzo szybko ($K \sim 6.7 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) i jest limitowana jedynie szybkością dyfuzji obu substratów [35]. Jeżeli więc, w jednym miejscu w organizmie w tym samym czasie spotkają się te dwa związki, powstanie nadtlenoazotyn. Wyliczone stałe szybkości reakcji wskazują, że reakcja powstawania ONOO^- jest prawie 3 razy szybsza niż reakcja kompetycyjna – katalizowana przez dysmutazę ponadtlenkową (SOD) przekształcanie $\text{O}_2\cdot^-$ do nadtlenku wodoru [36]. Wykazano, że podczas silnych infekcji bakteryjnych produkcja ONOO^- może osiągać poziom 50-100 $\mu\text{M}/\text{minutę}$ [37], zaś aktywowane makrofagi pęcherzykowe (zasiedlające płuca) mogą produkować 1 $\text{mM}/\text{minutę}$ ONOO^- [38]. ONOO^- skutecznie zabija patogeny poprzez swoje silne właściwości oksydacyjne oraz nitrowanie białek; zwłaszcza nitrowanie reszty tyrozyny w białkach może zaburzyć szlaki przekazywania sygnału w komórkach [21]. Koncepcja, że nadtlenoazotyn może być silnym inhibitorem odpowiedzi płytek krwi wynika z obserwacji, że jest to związek potencjalnie ingerujący w szlaki przekazywania sygnałów (co ma kluczowe znaczenie w bardzo szybkim procesie aktywacji płytek) oraz, że pochodzi on od tlenku azotu – naturalnego czynnika hamującego agregację płytek krwi w fizjologicznej hemostazie. Dotychczasowe badania nad wpływem ONOO^- na hemostazę pozwoliły stwierdzić, że związek ten (w relatywnie wysokich stężeniach, $\sim 1 \text{ mM}$) może bezpośrednio inaktywować niektóre białkowe czynniki krzepnięcia i fibrynolizy [39,40] oraz, że jest on efektywnym inhibitorem agregacji i sekrecji wieprzowych płytek krwi [41], a także, że hamuje retrakcję skrzepu [11,12]. Trzeba zaznaczyć, że badania te były jednak wykonywane w różnych układach eksperymentalnych (krew pochodząca od różnych organizmów modelowych, oczyszczone białka/osocze/krew pełna) co utrudniało estymację kompleksowego efektu ONOO^- na hemostazę. W związku z powyższym podjąłem badania celem scharakteryzowania takiego wpływu.

Biorąc pod uwagę liczne obserwacje, że stan zapalny silnie koreluje z ryzykiem zatorowo-zakrzepowym oraz fragmentaryczność dotychczasowej wiedzy o wpływie reaktywnych związków produkowanych w stanie zapalnym na hemostazę podjąłem badania nad scharakteryzowaniem kompleksowego wpływu HOCl i ONOO^- na hemostazę, których owocem jest cykl publikacji przedstawiony niniejszym do oceny. Identyfikacja efektów oddziaływania

HOCl i ONOO⁻ na hemostazę oraz charakterystyka natury tego wpływu są niezbędne do opracowania skutecznych strategii farmakologicznej kontroli hemostazy w stanach zapalnych.

II. Cel i zakres badań

a) Cele

Celem podjętych badań było przetestowanie hipotezy zakładającej, że silnie reaktywne związki powstające podczas stanu zapalnego, w relatywnie wysokich stężeniach, mogą oddziaływać na składniki krwi zaburzając hemostazę. Hipoteza ta opierała się na wcześniej uzyskanych przez mnie wynikach, stanowiących część rozprawy doktorskiej oraz opublikowanych jako dwie prace oryginalne [**Załącznik nr 4, poz. II, pkt. 4A, pozycja 1a i 2a oraz rozprawa doktorska**]. Założenie obejmowało kompleksowe zbadanie wpływu dwóch reaktywnych mediatorów stanu zapalnego – kwasu chlorowego (I) [HOCl] oraz nadtlenoazotynu (ONOO⁻) – na aspekty hemostazy obejmujące: aktywację płytek krwi, tworzenie skrzepu fibrynowo-płytkowego, jego architekturę, retrakcję i lizę. Warto zaznaczyć, że różne aspekty hemostazy mogą wykazywać różną wrażliwość względem HOCl czy ONOO⁻, a zidentyfikowanie takiej gradacji pozwoliłoby na bardziej precyzyjne szacowanie ryzyka zakrzepowo-zatorowego podczas stanów zapalnych.

Obok zbadania wpływu HOCl i ONOO⁻ na hemostazę, podjąłem także próbę zidentyfikowania prawdopodobnego mechanizmu takich oddziaływań, zwracając uwagę zarówno na składniki osocza jak i płytki krwi. Rozpocząłem także badania nad identyfikacją związków mogących potencjalnie chronić przed niekorzystnym wpływem HOCl na hemostazę.

b) Zakres badań obejmował wykonanie:

- oceny wpływu reaktywnych produktów stanu zapalnego (HOCl i ONOO⁻) na podstawowe odpowiedzi płytek krwi, takie jak: adhezja, sekrecja, agregacja, odpowiedź prokoagulacyjna [**H.1-H.3**]
- pomiarów kinetyki formowania skrzepów fibrynowych i fibrynowo-płytkowych w obecności badanych stresorów [**H.1-H.3**]

- oceny wpływu HOCl i ONOO⁻ oraz ich kombinacji na kinetykę retrakcji skrzepu wykorzystując różne układy doświadczalne – krew pełną, osocze bogatopłytkowe i układ rekonstruowany (zawierający wyizolowane płytki krwi i fibrynogen) [**H.1-H.3**]
- zbadania wpływu HOCl i ONOO⁻ na proces fibrylizacji [**H.2-H.4**]
- poszukiwań komórkowego mechanizmu hamowania retrakcji przez HOCl, obejmującego: ocenę polimeryzacji aktyny, generowanie sygnału wapniowego w płytkach krwi, metabolizm energetyczny płytek krwi, aktywację płytkowych receptorów wiążących fibrynogen [**H.1**]. Mechanizm hamowania retrakcji skrzepu przez ONOO⁻ został zbadany w ramach pracy doktorskiej, zaś wyniki opublikowane [**Załącznik nr 4, poz. II, pkt. 4A, pozycja 1a i 2a**].
- zbadania mechanizmu modulowania fibrylizacji przez HOCl i ONOO⁻ z uwzględnieniem ich wpływu na warunki powstawania fibryny (np. na generację trombiny), architekturę skrzepów fibrynowych i fibrynowo-płytkowych i aktywność czynników fibrynolitycznych [**H.2-H.4**],
- oceny czy naturalne polifenole pochodzenia roślinnego mogą chronić przed szkodliwym wpływem HOCl na hemostazę [**H.4**]

c) Warsztat badawczy:

Metodologia zastosowana podczas badań obejmowała metody szeroko stosowane w ocenie odpowiedzi płytek krwi oraz poszczególnych aspektów hemostazy (oraz metody pomocnicze, służące określeniu mechanizmu działania stresorów), takie jak:

Odpowiedzi płytek krwi

[*adhezja*] – pomiary statycznej adhezji płytek krwi do powierzchni trombogenicnej metodą kolorymetryczną, ocena dynamicznej adhezji płytek krwi do kolagenu w warunkach przepływu (technika *flow chamber*)

[*agregacja*] – pomiary agregacji płytek krwi metodą optyczną, tworzenie agregatów w warunkach przepływu (technika *flow chamber*)

[*sekrecja*] – pomiary sekrecji w ziarnistości gęstych (metodą luminometryczną) i z ziarnistości alfa (metodą cytometryczną i western blot)

[*odpowiedź prokoagulacyjna*] – ocena ekspresji fosfatydyloseryny na powierzchni płytek krwi oraz zrzucanie prokoagulacyjnych mikropęcherzyków (techniką cytometrii przepływowej)

[*retrakcja skrzepu*] – pomiary kinetyki retrakcji skrzepu we krwi pełnej, osoczu bogatopłytkowym i w układzie rekonstruowanym zawierającym płukane płytki krwi (metodą cyfrowej rejestracji zmian objętości skrzepu w czasie)

Kinetyka procesu krzepnięcia

Przebieg procesu krzepnięcia krwi pełnej był monitorowany z użyciem tromboelastometru rotacyjnego, a w osoczu ubogopłytkowym – metodą turbidometryczną. Generacja trombiny była mierzona metodą wykorzystującą substrat chromogeny.

Przebieg procesu fibrynolizy

Fibrynolizę oceniano we krwi pełnej (z wykorzystaniem tromboelastometru rotacyjnego), w osoczu bogatopłytkowym (poprzez fluorescencyjną detekcję produktów degradacji fibryny) oraz osoczu ubogopłytkowym (metodą turbidometryczną). Aktywność plazminy mierzona była metodą wykorzystującą substrat chromogeny oraz metodą zymografii żelowej. Wiązanie znakowanego fluorescencyjnie plazminogenu do fibryny w warunkach przepływu oceniano z wykorzystaniem mikroskopu konfokalnego.

Analiza architektury skrzepu

Gęstość i grubość włókien fibryny w skrzepach fibrynowych i fibrynowo-płytkowych rejestrowano w mikroskopie konfokalnym i poddawano analizie w programie ImageJ.

Pozostałe techniki badawcze obejmowały: syntezę nadtlenoazotynu w reaktorze przepływowym w fazie ciekłej, oczyszczanie i znakowanie fluorescencyjne laktadheryny wołowej (sonda molekularna do detekcji/blokowania fosfatydyloseryny na powierzchni błony komórkowej), ocenę metabolizmu energetycznego płytek krwi (pomiar zawartości ATP techniką luminometryczną, pomiar produkcji mleczanu metodą enzymatyczną z detekcją spektrofotometryczną, pomiar konsumpcji tlenu przez płytki krwi metodą polarograficzną [elektroda Clarka], ocena zmian mitochondrialnego potencjału transbłonowego w płytkach krwi z użyciem sondy fluorescencyjnej), fluorymetryczne oznaczanie zmian w cytozolowym stężeniu

jonów wapnia w płytkach krwi, fluorymetryczne pomiary tworzenia dityrozyny w cząsteczkach fibrynogenu eksponowanych na HOCl, pomiary uszkodzenia płytek krwi poprzez uwalnianie dehydrogenazy mleczanowej, ocena stopnia polimeryzacji aktyny w płytkach techniką elektroforezy żelowej, oznaczanie grup –SH w białkach osocza metodą spektrofotometryczną, pomiar aktywności czynnika krzepnięcia XIII metodą spektrofotometryczną.

Mając na względzie wieloaspektowość hemostazy, pociągającą za sobą konieczność stosowania szerokiego spektrum metod badawczych, istotną płaszczyzną prowadzonych przeze mnie badań było udoskonalenie obecnych w Zakładzie Chemii Fizycznej UMB technik badawczych oraz implementacja nowych. Pozwoliło to na precyzyjną i powtarzalną ocenę zarówno wczesnych etapów formowania czopu płytkowego w warunkach zbliżonych do fizjologicznego przepływu krwi (adhezja, agregacja), jak i odpowiedzi prokoagulacyjnej płytek krwi, kinetyki powstawania i retrakcji skrzepu fibrynowo-płytkowego, jego architektury i fibrynolizy.

Podczas prowadzenia badań, stanowiących podstawę osiągnięcia naukowego przedłożonego do oceny, wykorzystywałem zmodyfikowaną wersję metody pomiaru retrakcji skrzepu wg Osdoit i Rosa [42]. Zastosowana modyfikacja polegała na dostosowaniu oryginalnej metody (w której używano płukanych płytek krwi, zawieszonych w sztucznym środowisku) do środowiska krwi pełnej i osocza bogatopłytkowego. Zaletą zastosowanej metody była możliwość cyfrowej rejestracji zmian objętości skrzepu fibrynowo-płytkowego w czasie na każdym etapie – od jego uformowania, poprzez etap szybkiej retrakcji, aż do momentu stabilizacji (maksymalne obkurczenie skrzepu). Śledzenie kinetyki procesu pozwala na zauważenie już stosunkowo niewielkich, lecz statystycznie istotnych, zmian w szybkości retrakcji i bardziej wiarygodną ocenę czynnika potencjalnie hamującego retrakcję niż w przypadku starszej metody – polegającej na pomiarze końcowej objętości osocza „wyciśniętego” przez ulegający retrakcji skrzep (pomiar w 1 punkcie czasowym i brak danych dotyczących kinetyki).

Metodą wprowadzoną przeze mnie do warsztatu badawczego Zakładu Chemii Fizycznej po pobycie na Uniwersytecie w Maastricht w 2015 r., była technika określana terminem „komory przepływowej” (*flow chamber* [43]). Ideą metody jest wykorzystanie precyzyjnej pompy infuzyjnej i komory przepływowej, w której eksperymentator ma możliwość

symulowania *in vitro* warunków przepływu krwi obserwowanych w różnych naczyniach krwionośnych (uzyskując w komorze odpowiednie szybkości ścinania i naprężenia ścinające stosowne dla danego naczynia). Aktywacja płytek krwi i wytwarzanie czopu płytkowego zachodzi w warunkach przepływu w komorze poprzez kontakt krwi pełnej ze swobodnie definiowalną powierzchnią trombogenną (np. pokrytą kolagenem). Tego typu badania w przepływie, z powiązaniu z wysokorozdzielczą mikroskopią fluorescencyjną/konfokalną, pozwalają na ocenę wszystkich etapów formowania czopu płytkowego (adhezja, sekrecja, agregacja) w warunkach reologicznych bliskich fizjologicznym. Dodatkowo, metoda ta umożliwia rejestrowanie wytwarzania fibryny na powierzchni aktywowanych płytek krwi, wiązanie czynników fibrynolitycznych, a także stopniową fibrylizę.

Przy badaniach nad wpływem reaktywnych produktów stanu zapalnego na hemostazę istotnym aspektem było sprawdzenie czy te związki są w stanie modyfikować architekturę skrzepów i przez to potencjalnie modulować szybkość fibrylizy, gdyż grubość włókien fibryny i stopień ich usieciowania wyraźnie wpływają na szybkość degradacji fibryny [44]. Istotne, w niniejszym przedłożonych do oceny wynikach badań, było zatem opracowanie metodyki wytwarzania skrzepów fibrynowych i fibrynowo-płytkowych, w różnych warunkach (np. w obecności bądź absencji płytek o fenotypie prokoagulacyjnym) i opracowanie metody analizy wyników. Rezultatem podjętych prób jest zaadaptowanie zminiaturyzowanej (wymagającej zaledwie 25 μ l osocza) mikro-płytkowej metody wytwarzania znakowanych fluorescencyjnie próbek skrzepów, które następnie po rejestracji w mikroskopie konfokalnym są poddawane analizie pod kątem grubości/gęstości włókien fibryny.

III. Omówienie głównych wyników opisanych w publikacjach stanowiących osiągnięcie naukowe

Pierwsza z prac tworzących cykl przedstawiony do oceny (*Clinically relevant HOCl concentrations reduce clot retraction rate via the inhibition of energy production in platelet mitochondria. Free Radical Research. 2014; 48(12): 1443-1453*), dotyczyła zbadania wpływu HOCl na retrakcję skrzepu oraz wskazania możliwego mechanizmu takiego oddziaływania. Wpływ HOCl na retrakcję jest bardzo prawdopodobny, gdyż związek ten zaburza funkcje mitochondriów w modelowych komórkach [27], zaś zmniejszenie wydajności energetycznej

płytek krwi silnie koreluje z zahamowaniem retrakcji [11,12]. Przez długi czas uważano, że do zahamowania odpowiedzi płytek wymagane były relatywnie wysokie stężenia HOCl (milimolarne) [32,33], podczas gdy nasze badania wykazały, że związek ten może wpływać na hemostazę w stężeniach bliskim tym, które mogą pojawiać się *in vivo*. Badania, których wyniki przedstawiono w opisywanej pracy, zostały przeprowadzone na modelu wieprzowych płytek krwi, które wykazują liczne podobieństwa względem płytek ludzkich i są powszechnie akceptowane jako model doświadczalny w badaniach hemostazy [45,46].

Wykazano, że HOCl, w sposób zależny od stężenia, hamował szybkość retrakcji skrzepu we krwi pełnej (stężenie progowe = 100 μM ; IC_{50} = 360 μM), w osoczu bogatopłytkowym (stężenie progowe = 50 μM ; IC_{50} = 250 μM), jak i w układzie rekonstruowanym zawierającym płukane płytki krwi i fibrynogen (stężenie progowe = 25 nM; IC_{50} = 100 nM). Taka gradacja efektu gdzie siła działania stresora maleje wraz ze wzrostem liczby obiektów/molekuł na które może oddziaływać (krew pełna jest bogatszym w składniki środowiskiem niż PRP, a to z kolei jest bogatsze niż układ zawierający płytki płukane) sugeruje, że efekt HOCl jest niespecyficzny i zależy od warunków, w których mogą manifestować się jego utleniające właściwości. Prawdopodobny mechanizm, poprzez który HOCl hamuje retrakcję to zahamowanie metabolizmu energetycznego płytek krwi; zaobserwowano bowiem, że wraz ze wzrostem stężenia HOCl obniżeniu ulegała całkowita zawartość ATP w płytkach krwi, zwiększeniu ulegała natomiast produkcja mleczanu. Płytki krwi charakteryzują się specyficznym metabolizmem energetycznym, gdzie pomimo wybitnie tlenowego środowiska w którym bytują (krew), głównym produktem glikolizy jest kwas mlekowy – z reguły powstający w komórkach w warunkach deficytu tlenowego [47]. Jako, że glikoliza i oddychanie komórkowe (mitochondrialna produkcja energii) są ze sobą funkcjonalnie powiązane efektem Pasteura (w konsekwencji zahamowania oddychania komórkowego następuje nasilenie glikolizy) [48], to zwiększona produkcja mleczanu sugeruje zaburzenie pracy mitochondriów przez HOCl, a przez to zmniejszenie produkcji ATP. Podobny zakres stężeń HOCl, jak ten wywołujący powyższy efekt, ograniczał pobór tlenu przez płytki krwi, co dodatkowo potwierdza dysfunkcję mitochondriów (są one głównym miejscem konsumpcji tlenu w płytkach). Co więcej, HOCl zmniejszał mitochondrialny potencjał transbłonowy, warunek *sine qua non* do zachodzenia fosforylacji oksydacyjnej i syntezy ATP w mitochondriach. Obserwacje te świadczą o

ograniczonej przez HOCl produkcji ATP w płytkach krwi czego rezultatem jest upośledzenie retrakcji skrzepu. Co warto wspomnieć, dodanie do uprzepuszczalnych (saponizowanych) płytek zewnętrznego Mg-ATP normalizowało zahamowaną przez HOCl retrakcję skrzepu, co podkreśla rolę produkcji energii w mechanizmie oddziaływania HOCl na retrakcję. Jednocześnie wykazano, że HOCl nie wpływa na inne mechanizmy regulujące retrakcję, jak: polimeryzacja aktyny w cytoplazmie płytek krwi (konieczna do wytworzenia aktywnego aparatu kurczliwego), generowanie sygnału wapniowego w płytkach krwi (jony wapnia są niezbędne do aktywacji aparatu kurczliwego) czy wiązanie fibrynogenu do płytkowych receptorów GPIIb/IIIa (co pośredniczy w przekazywaniu siły kurczliwej kolejnym płytkom).

Za szczególnie istotną obserwację należy przyjąć, że HOCl może działać synergistycznie z ONOO⁻ w hamowaniu retrakcji skrzepu; przy jednoczesnym podaniu obu stresorów wymagane są znacznie niższe ich stężenia do wywołania efektu zahamowania retrakcji niż w przypadku ich osobnego działania.

Wyniki te wspierają hipotezę, że produkowane w stanie zapalnym wysoce reaktywne związki mogą przyczyniać się do upośledzenia procesu retrakcji w warunkach fizjologicznych [12]. Zatem, w przebiegu chorób związanych z przewlekłym lub ostrym stanem zapalnym, gdzie aktywowane komórki stanu zapalnego produkują znaczne ilości reaktywnych form tlenu i azotu, należy oczekiwać zaburzeń retrakcji skrzepu. Taka sytuacja może zachodzić np. w astmie, gdzie permanentnie aktywowane komórki stanu zapalnego mogą produkować: nadtlenek wodoru, tlenek azotu, nadtlenoazotyn czy kwas chlorowy (I) [49]. Wyniki uzyskane przez zespół badawczy, którego byłem członkiem, wykazały, że u takich pacjentów obserwuje się znacznie wolniejszą retrakcję, zwiększoną produkcję mleczanu przez płytki izolowane z krwi pacjentów (świadcząca o możliwym zahamowaniu mitochondrialnej produkcji energii) oraz zahamowaną fibrylizę (**Załącznik nr 4, poz. II, pkt. 4B, pozycje 1 i 4**). Spowolniona retrakcja oraz osłabiona fibrylizacja u pacjentów z astmą może przyczyniać się do dłuższego okresu utrzymywania się wytworzonego skrzepu w świetle naczynia krwionośnego oraz stanowić jeden z patomechanizmów przyczyniających się do powstawania tromboembolizmu płucnego (niedrożność naczyń krwionośnych spowodowana skrzeplinami), którego podwyższone ryzyko (nawet 7-krotne) obserwuje się w astmie [50]. Podsumowując, uzyskane wyniki wyraźnie wskazują, że klinicznie istotne stężenia HOCl, mogące pojawiać się we krwi podczas stanów

zapalnych, mogą w sposób istotny hamować retrakcję skrzepu co sugeruje rolę HOCl w patogenezie epizodów zakrzepowo-zatorowych obserwowanych w przebiegu niektórych chorób o podłożu zapalnym. Prawdopodobny mechanizm wpływu HOCl na retrakcję skrzepu to zaburzenie produkcji energii w mitochondriach płytek krwi. Jednoczesna obecność HOCl i ONOO⁻ skutkuje silnym, synergistycznym hamowaniem retrakcji skrzepu co podkreśla podatność retrakcji na zaburzenia wywołane obecnością reaktywnych produktów stanu zapalnego.

Druga z prac cyklu przedstawionego do oceny (*Peroxynitrite may affect fibrinolysis via the reduction of platelet-related fibrinolysis resistance and alteration of clot structure*” *Free Rad. Biol. Med.* 2015; 89:533-547) dotyczyła zbadania wpływu klinicznie istotnych stężeń ONOO⁻ na zdolność płytek krwi do regulowania procesu fibrynolizy. Płytki krwi są osią mechanizmu określanego jako „oporność na fibrylizę zależna od płytek krwi” (*ang. platelet-related fibrinolysis resistance*), który zmniejsza szybkość fibrynolizy, wydłużając tym samym czas do reperacji uszkodzenia naczynia. W warunkach stanu zapalnego, któremu towarzyszy produkcja reaktywnych związków mogących hamować płytki krwi, mechanizm ten może być potencjalnie modulowany, prowadząc do wzrostu ryzyka zakrzepowo-zatorowego. Wcześniejsze badania zespołu Zakładu Chemii Fizycznej UMB pozwoliły stwierdzić, że ONOO⁻ hamuje retrakcję skrzepu we krwi ludzkiej i wieprzowej poprzez – podobnie jak czyni to HOCl – zahamowanie mitochondrialnej produkcji energii w płytkach krwi (**Załącznik nr 4, poz. II, pkt. 4A, pozycje 1a i 2a**). W niniejszej pracy podjęto próbę zbadania relacji pomiędzy osłabioną przez ONOO⁻ reaktywnością płytek krwi, a procesem fibrynolizy. Warto przywołać, że w przebiegu części chorób gdzie stwierdza się znacznie nasiloną produkcję reaktywnych form azotu (np. w sepsie), obserwuje się nasiloną fibrylizę [18,21]. Płytki krwi mogą regulować proces fibrynolizy poprzez: (1) zapewnianie retrakcji skrzepu (efektywna retrakcja utrudnia wiązanie i wnikanie czynników fibrynolitycznych w strukturę skrzepu [51]), (2) amplifikację powstawania aktywnej trombiny poprzez odpowiedź prokoagulacyjną płytek krwi (ilość aktywnej trombiny przekłada się na właściwości mechaniczne skrzepu i jego odporność na lizę [52]), oraz (3) poprzez sekrecję białkowych inhibitorów fibrynolizy [53].

Badania wykazały, że ONOO⁻ silnie i w sposób zależny od stężenia hamuje retrakcję skrzepu (stężenie progowe w osoczu bogatopłytkowym = 10 μM; IC₅₀ = 75 μM). Dalej, zaobserwowano, że zahamowanie retrakcji skrzepu przez ONOO⁻ koresponduje z nasileniem fibrynolizy, przy podobnym zakresie stężeń stresora, tj. 10-300 μM. Należy zaznaczyć, że fibrynoliza była nasiloną tylko w obecności płytek krwi, a obecność ONOO⁻ osoczu nawet w znacznie wyższych stężeniach (powyżej 1 mM), nie przyspieszała fibrynolizy. Wyniki te wspierają hipotezę zakładającą regulacyjną rolę retrakcji względem lizy skrzepu.

Dalsze badania wskazywały, że zwiększenie szybkości fibrynolizy może być także powiązane z osłabieniem odpowiedzi prokoagulacyjnej płytek krwi, mierzonej w niniejszym badaniu jako ekspresja fosfatydyloseryny na powierzchni błony aktywowanych (kolagenem) płytek, oraz zrzucanie prokoagulacyjnych mikropęcherzyków (pęcherzyków fosfolipidowych, z bogatą w fosfatydyloserynę zewnętrzną monowarstwą błony). Obszary błony bogate w fosfatydyloserynę stanowią powierzchnię katalityczną, na której dochodzi do szybkiej generacji dużych ilości trombiny. Wzrost stężenia trombiny przyczynia się powstawania gęstych, bardziej usieciowanych skrzepów (są one bardziej odporne na lizę), podczas gdy w obecności niższych stężeń trombiny powstają grubsze włókna fibrynowe, ale słabiej usieciowane i łatwiej ulegające fibrynolizie [44]. Jako, że wyniki badań wskazały, że ONOO⁻ zmniejsza – w sposób zależny od stężenia – ekspresję fosfatydyloseryny, oraz związaną z tym generację trombiny, kolejnym krokiem było sprawdzenie czy obecność ONOO⁻ będzie wpływała na architekturę powstającej sieci fibryny. Wyniki wskazały, że ONOO⁻ zmniejsza stopień usieciowania i grubość włókien fibryny powstających w obecności aktywowanych płytek, w stopniu podobnym co laktadheryna – silny bloker fosfatydyloseryny izolowany z mleka wołowego (przez autora badań). Jednocześnie, ONOO⁻ nie wpływał na architekturę skrzepów pozbawionych płytek krwi. Wskazuje to, że ONOO⁻ może promować fibrynolizę poprzez hamowanie płytkowej odpowiedzi prokoagulacyjnej, co przekłada się na zmniejszoną generację trombiny i zmiany w architekturze skrzepu, który łatwiej ulega lizie.

Ponadto, zaobserwowano, że wydzielanie (sekrecja) inhibitorów fibrynolizy przez aktywowane płytki wyraźnie osłabia aktywność plazminy (enzym proteolityczny przeprowadzający degradację fibryny) jak i tkankowego aktywatora plazminogenu (główny

inicjator procesu fibrylizy przekształcający plazminogen do plazminy). Efekt ten był wyraźnie zredukowany w obecności ONOO⁻ co wskazuje na zahamowanie sekrecji płytkowych inhibitorów fibrylizy przez tę reaktywną formę azotu.

Reasumując, przeprowadzone pomiary wskazują, że ONOO⁻, produkowany w wysokich stężeniach w stanie zapalnym, może promować fibrylizę poprzez redukcję „oporności na fibrylizę zależnej od płytek krwi”. Może to stwarzać ryzyko przedwczesnego rozpuszczenia skrzepu i krwawienia przy jednoczesnym odsłonięciu wciąż trombogenicnej powierzchni uszkodzonego naczynia. Interesujące, że siła hamowania przez ONOO⁻ poszczególnych odpowiedzi płytek krwi zaangażowanych w powyższy mechanizm zależała od stężenia stresora. Siła efektu hamującego układała się wg następującego porządku: retrakcja skrzepu (najbardziej wrażliwa, IC₅₀ = 75 μM) > sekrecja (IC₅₀ = 100 μM) > odpowiedź prokoagulacyjną (IC₅₀ = 150 μM). Przeprowadzone badania pozwalają też stwierdzić, że retrakcja skrzepu jest najczulszym na działanie ONOO⁻ elementem „oporności na fibrylizę zależnej od płytek krwi” i w warunkach stanu zapalnego jej zahamowanie będzie realizowało się już przy relatywnie niskich stężeniach stresora.

Przyjmując, że dekompozycja ONOO⁻ przebiega zgodnie z kinetyką pseudopierwszego rzędu ($[ONOO^-]_0/k_1$ ($k_1=0.64 s^{-1}$),) użycie pojedynczej dawki (bolus) ONOO⁻ o stężeniu 300 μM odpowiada ekspozycji na ONOO⁻ o stężeniu stacjonarnym 1 μM przez około 8 minut, co jest prawdopodobne *in vivo* [35,38]. Jako, że większość efektów ONOO⁻ obserwowano w zakresie stężeń (dodawanych do prób badanych jako bolus) 25-300 μM, można założyć, że zawierają się one w przedziale, który jest klinicznie istotny. Podczas silnych infekcji bakteryjnych produkcja ONOO⁻ może osiągać poziom 50-100 μM/minutę [37], zaś aktywowane makrofagi pęcherzykowe (zasiedlające płuca) mogą produkować 1 mM/minutę ONOO⁻ [35,38].

W świetle powyższego, należy spodziewać się, że nasiloną produkcją ONOO⁻ w ostrych/przewlekłych stanach zapalnych będzie stwarzać ryzyko zakrzepowo-zatorowe (zahamowana retrakcja zwiększa ryzyko tromboembolizmu), ale także ryzyko przedwczesnej lizy zakrzepu. Mogło by to dodatkowo osłabić jego właściwości mechaniczne i przyczynić się do zwiększonego ryzyka zarówno oderwania zakrzepu i embolizacji naczynia jak i krwawienia z niezreperowanego, a przedwcześnie odsłoniętego miejsca uszkodzenia naczynia. Wskazuje to

na potrzebę ścisłego monitorowania parametrów stanu zapalnego u pacjentów z ryzykiem zakrzepowo-zatorowym lub/i ryzykiem nadmiernego krwawienia. Jednocześnie, od strony metodycznej, uzyskane wyniki wyraźnie wskazują jak czułym testem na zmienioną reaktywność płytek krwi w stanie zapalnym może być badanie kinetyki retrakcji skrzepu, mierzona metodą zastosowaną w omawianej pracy.

Jako, że różne odpowiedzi płytek krwi wykazują inną podatność na działanie ONOO^- , kolejnym krokiem było sprawdzenie hipotezy, że podobnie może być również w przypadku HOCl. W **trzeciej** z cyklu prac przedstawionych do oceny (*The myeloperoxidase product, hypochlorous acid, reduces thrombus formation under flow and attenuates clot retraction and fibrinolysis in human blood. Free Radical Biology and Medicine. 2019: 141; 426-437*) podjąłem się zbadania wpływu fizjologicznych (mikromolarnych) stężeń HOCl na poszczególne etapy hemostazy: tworzenie agregatów płytkowych w warunkach przepływu, tworzenie skrzepów fibrynowo-płytkowych, retrakcję skrzepu i fibrynolizę. Analizie została poddana także architektura skrzepów. Celem towarzyszącym było określenie efektywnych stężeń HOCl modulujących hemostazę we krwi ludzkiej (poprzednie badania nad wpływem HOCl na płytki krwi zostały wykonane na krwi wieprzowej [**H.1**], lub króliczej [33]).

Badania wykazały, że relatywnie wysokie, aczkolwiek wciąż prawdopodobne *in vivo*, stężenia HOCl (500-1000 μM) znacząco hamują tworzenie agregatów płytkowych na powierzchniach pokrytych kolagenem w warunkach przepływu, symulującego tętniczy przepływ krwi. HOCl, nawet w milimolarnych stężeniach, nie był w stanie natomiast zahamować tworzenia skrzepów fibrynowo-płytkowych. Z kolei badania nad wpływem HOCl na kinetykę retrakcji skrzepu i fibrynolizy wykazały, że są to zdecydowanie bardziej wrażliwe na działanie stresora aspekty hemostazy. Istotnie statystycznie hamowanie retrakcji obserwowano już przy stężeniu HOCl wynoszącym 50 μM , zaś fibrynolizy przy 125 μM . Co istotne, zahamowanie fibrynolizy było porównywalne we krwi pełnej jak i osoczu pozbawionym płytek krwi, co sugeruje, że efekt ten nie zależał od wpływu HOCl na płytki krwi. Warto zauważyć, że – inaczej niż miało to miejsce w przypadku ONOO^- , gdzie zahamowanie retrakcji korespondowało z przyspieszoną fibrynolizą – HOCl hamuje oba te procesy. Zatem, dalszym krokiem było zidentyfikowanie mechanizmu, poprzez który HOCl zmniejsza szybkość lizy skrzepu.

Wykazano, że HOCl – w zakresie stężeń silnie hamujących fibrylizę – nie zmniejsza aktywności plazminy (enzym degradujący fibrynę), jak również nie zmniejsza wiązania plazminogenu do fibryny w warunkach przepływu (co jest pierwszym etapem aktywacji plazminogenu do aktywnej formy, plazminy). Sugeruje to, że za zmniejszoną szybkość lizy skrzepu w obecności HOCl może odpowiadać inny mechanizm, np. zmieniona architektura skrzepu. Obserwacje w mikroskopie konfokalnym wykazały, że obecność HOCl – w stężeniach korespondujących z tymi, które hamowały lizę skrzepu – powoduje formowanie sieci fibryny o gęściej upakowanych włóknach, tj. struktury o większej oporności na lizę. Ponieważ wzrost gęstości fibryny był obserwowany tak w obecności jak i przy braku płytek krwi, należało zweryfikować czy efekt obserwowany w obecności płytek może być związany z ewentualnym nasileniem płytkowej odpowiedzi prokoagulacyjnej i w konsekwencji z większą produkcją aktywnej trombiny. Lokalne stężenie trombiny determinuje bowiem gęstość i rozmiar włókien fibryny w sposób bezpośredni (katalizując polimeryzację fibrynogenu do fibryny) jak i przez aktywację czynnika XIII – czynnika sieciującego fibrynę [54]. Wyniki eksperymentów wykazały, że HOCl nie powoduje wzrostu odpowiedzi prokoagulacyjnej płytek krwi, ani wzmocnienia generacji trombiny czy dodatkowej aktywacji czynnika XIII. Źródła zmienionej struktury sieci fibryny powstającej w obecności HOCl należy zatem upatrywać w osoczu. Dodatkowe badania wykazały, że HOCl zmienia wzorzec polimeryzacji fibrynogenu także w układzie zawierającym oczyszczony fibrynogen i egzogenną trombinę w kierunku zwiększonej gęstości włókien powstającej fibryny. Efekt ten nasilał się w sposób zależny od stężenia i korespondował z pojawieniem się dityrozyny w obrębie cząsteczek fibrynogenu – modyfikacji oksydacyjnej uznawanej za marker obecności HOCl [55]. Konkludując, obserwowana silna redukcja szybkości fibrylizy w obecności HOCl – tak w osoczu jak i we krwi pełnej – wynika z wpływu tej reaktywnej formy chloru na fibrynogen, co przekłada się na zmienioną architekturę sieci fibryny, w kierunku struktury bardziej odpornej na lizę.

Chorobą z fenotypem zakrzepowym, w której obserwuje się podobny wzorzec zmian hemostazy, tj. zmniejszoną szybkość retrakcji skrzepu i zahamowaną fibrylizę wraz ze zmienioną architekturą skrzepu, jest astma. Astma, przewlekła choroba o podłożu zapalnym, wiąże się z blisko 7-krotnym wzrostem ryzyka zatorowości płucnej [50,56]. Co więcej, w osoczu

pobrany od pacjentów z astmą stwierdza się podwyższony poziom mieloperoksydazy [57], zaś w białkach osocza obecność 3-chlorotyrozyny – będącej markerem obecności HOCl [58].

Biorąc powyższe pod uwagę, można zatem podejrzewać, że zaobserwowane w omawianej pracy efekty HOCl na hemostazę mogą manifestować się także *in vivo* w przebiegu chorób przebiegających ze stanem zapalnym gdzie prawdopodobne jest pojawienie się wysokich stężeń HOCl, takich jak astma.

Warto podkreślić, że efekty wywierane przez ONOO⁻ i HOCl na powiązane ze sobą procesy retrakcji i fibrylizy różnią się od siebie. ONOO⁻ jest w stanie hamować retrakcję skrzepu i jednocześnie redukować „zależną od płytek krwi oporność na fibrylizę” i tym samym przyspieszać proces lizy skrzepu (**H.2**). HOCl z kolei jest efektywnym inhibitorem zarówno retrakcji (poprzez wpływ na płytki krwi, **H.1**), jak i fibrylizy (poprzez wpływ na fibrynogen, **H.3**). Ponadto, co zademonstrowano w **H.1**, HOCl i ONOO⁻ mogą hamować synergistycznie retrakcję, co potencjalnie może prowadzić do zwiększonego ryzyka tromboembolizmu. Jednak wpływ tych dwóch reaktywnych produktów stanu zapalnego na fibrylizę jest przeciwstawny, zatem niewykluczone jest wzajemne maskowanie tego efektu w warunkach jednoczesnej produkcji obu stresorów. Tym samym, w świetle wyników przedstawionych w **H.1-H.3** retrakcja skrzepu jest etapem hemostazy najbardziej podatnym na zahamowanie przez występujące *in vivo* w relatywnie wysokich stężeniach reaktywne produkty stanu zapalnego – ONOO⁻ i HOCl.

Mając na uwadze, że efekty wywierane przez HOCl na hemostazę w warunkach *in vitro* (**H.1,H.3**), tj. zahamowanie retrakcji i fibrylizy (czemu towarzyszy zmieniona architektura skrzepów), są zbieżne z zaburzeniami hemostazy obserwowanymi we krwi pobranej od pacjentów z astmą [**Załącznik nr 4, poz. II, pkt. 4B, pozycje 1 i 4**], należy stwierdzić, że poszukiwanie sposobów na redukcję toksycznego efektu wysokich stężeń HOCl we krwi jest uzasadnione i klinicznie potrzebne. W związku z powyższym, podjąłem badania nad potencjałem „anty-HOCl” polifenolowych antyoksydantów pochodzenia roślinnego. **W czwartej** z cyklu prac przedstawionych do oceny (*Natural polyphenols may normalize hypochlorous acid-evoked hemostatic abnormalities in human blood. Antioxidants. 2022: 11(4) 13 pp; Article ID 779*) poddano ocenie czy obecność polifenoli – resweratrolu (Resv), kwercetyny (Que) i gallusanu epigallokatechiny (EGCG) – może chronić hemostazę przed zmianami wywołanymi przez HOCl.

Celem przeprowadzonych pomiarów było wskazanie stężeń badanych związków, które znosiłyby efekt wywołany przez obecność HOCl. Stężenia stresora (HOCl) dobrano tak, aby wywoływały one 50-procentowe zahamowanie bądź wzmocnienie badanej odpowiedzi płytek czy danego aspektu hemostazy. Jak wykazano, Que (5-25 μM) i EGCG (10-25 μM) znoszą, w sposób zależny od stężenia, wywołane przez HOCl zahamowanie agregacji płytek krwi w osoczu bogatopłytkowym (indukowane kolagenem), podczas gdy jednoczesna inkubacja płytek krwi z Resv (10-25 μM) i HOCl, wzmacnia hamujący efekt wywierany przez HOCl. Podobny obraz przedstawiały eksperymenty, w których analizowano tworzenie agregatów płytkowych w warunkach przepływu we krwi pełnej (wartość szybkości ścinania [*shear rate*] odpowiadały warunkom tętnicznym, tj. 1000 s^{-1}) – i w tym przypadku Resv nasilał, w sposób zależny od stężenia (50-100 μM), hamowanie tworzenia agregatów płytkowych na powierzchniach pokrytych kolagenem. Jednocześnie Que (10-50 μM) i EGCG (25-100 μM) chroniły przed hamującym wpływem HOCl w tym modelu eksperymentalnym. Warto podkreślić, że wszystkie 3 badane polifenole (w zakresie stężeń 5-25 μM) skutecznie chroniły przed zaburzeniami fibrylizacji i zmianami w architekturze skrzepów fibrynowych mierzonymi w osoczu pozbawionym płytek krwi. Obserwacje te świadczą o tym, że nasilenie efektu HOCl przez Resv obserwowane we krwi pełnej i osoczu bogatopłytkowym odbywa się poprzez wpływ tych związków na płytki krwi. Potwierdzeniem hipotezy zakładającej, że protekcyjne działanie Que, EGCG i Resv wobec HOCl w osoczu opiera się na właściwościach antyoksydacyjnych tych polifenoli są obserwacje, że związki te efektywnie zapobiegają utlenianiu grup –SH w białkach osocza wystawionego na działanie HOCl (marker utleniającego działania HOCl) w stężeniach podobnych do tych, które normalizowały fibrylizację i strukturę skrzepu. Głównym wnioskiem z przeprowadzonych badań jest użyteczność kwercetyny i gallusanu epigallokatechiny w normalizacji zaburzeń hemostazy obserwowanych podczas stanów zapalnych, którym towarzyszy produkcja wysokich stężeń HOCl. Jednocześnie, resweratrol wykazuje efektywne działanie „anty-HOCl” w osoczu ubogopłytkowym, zaś w obecności płytek krwi (krew pełna lub osocze bogatopłytkowe) nasila on hamujący wpływ HOCl wobec płytek.

Potencjalnym wytłumaczeniem odmiennego działania Resv może być jego działanie na specyficzne szlaki sygnałowe w płytkach krwi, co w połączeniu z hamującym wpływem HOCl skutkowało by wzmocnioną redukcją agregacji płytek. Dostępne dane wskazują, że Resv jest w

stanie aktywować ścieżki hamujące pobudliwość płytek krwi (np. szlak tlenek azotu/cyklaza guanylanowa/kinaza białkowa G), jak również ograniczać wzrost cytozolowego stężenia jonów wapnia w płytkach i hamować aktywność specyficznych kinaz białkowych zaangażowanych w aktywację płytki [59,60]. Odpowiednio, HOCl może hamować mitochondrialną produkcję energii i napływ jonów wapnia do cytozolu płytek krwi [H.1]. Jest powszechnie akceptowane, że wzrost cytozolowego stężenia jonów wapnia jest warunkiem *sine qua non* do aktywacji płytkowych receptorów GPIIb/IIIa, co umożliwia płytkom krwi wiązanie osocznego fibrynogenu i w rezultacie powstawanie agregatów płytkowych [61]. Dodatkowo, zmniejszenie stężenia wapnia w cytozolu płytek powinno także prowadzić do zmniejszenia produkcji tromboksanu A2 oraz sekrecji z ziarnistości wydzielniczych płytek krwi, jako że oba te procesy są zależne od jonów wapnia [62,63]. Sekrecja wtórnych aktywatorów płytek krwi z ich ziarnistości gęstych (główną rolę odgrywa wydzielony ADP) oraz powstawanie tromboksanu A2 są kluczowe do aktywacji kolejnych płytek napływających z prądem krwi do miejsca inicjacji tworzenia czopu hemostatycznego, w które zaangażowane są płytki zadherowane w miejscu uszkodzenia naczynia i tworzące pierwotną monowarstwę, na której rozbudowuje się czop płytkowy [64,65]. Zahamowana w ten sposób agregacja może tłumaczyć zmniejszenie wielkości agregatów płytkowych powstających w warunkach przepływu na powierzchni pokrytej kolagenem w obecności Resv i HOCl względem próbek z samym HOCl. W przypadku Que i EGCG natomiast, ich obecność znosiła antypłytkowe działanie HOCl w podobnym zakresie stężeń do tych, które przeciwdziałały utlenianiu przez HOCl grup –SH w białkach osocza. Wskazuje to, że antyoksydacyjne właściwości Que i EGCG odpowiadają w pierwszej kolejności za obserwowany efekt „anty-HOCl”.

W kontekście rozważań czy polifenole mogą efektywnie osłaniać hemostazę przed zaburzającym wpływem HOCl, warto zadać pytanie czy są one w stanie *per se* modulować hemostazę, ale także czy związki te mogłyby wpływać na skuteczność farmakoterapii przeciwplatekowej.

Warto zaznaczyć, że stężenia zbadanych polifenoli, wykazujące właściwości „anty-HOCl” są kilkukrotnie niższe od tych, które są wskazywane jako zdolne hamować *per se* odpowiedzi płytek krwi, co również zostało wykazane w opisywanej pracy [H.4]. Wskazuje to, że niskie mikromolarne stężenia polifenoli mogą mieć przede wszystkim właściwości ochronne

względem składników układu hemostazy w warunkach stanu zapalnego i związanej z nim nasilonej produkcji oksydantów, np. HOCl. Z kolei bezpośrednie działanie przeciwplatek Que i EGCG *in vivo* wydaje się być silnie limitowane potrzebą osiągnięcia relatywnie wysokich stężeń tych związków we krwi, co wydaje się poza zasięgiem obecnie stosowanych strategii suplementacji.

Wiele naturalnie występujących związków organicznych wykazuje hamowanie izoform cytochromu P450 (CYP450), mikrosomalnego układu enzymatycznego, który uczestniczy w bioaktywacji licznych leków, w tym szeroko stosowanych leków przeciwplatekowych z grupy antagonistów receptora purynergicznego P2Y₁₂ (ligandem dla tego receptora jest ADP), tj. klopidoogrelu, prasugrelu i tiklopidyny, które aktywuje do postaci aktywnego leku izoforma 2C19 cytochromu P450 [66]. Wyznaczone wartości IC₅₀ hamowania aktywności tej izoformy CYP450 dla Que, EGCG i Resv wynoszą odpowiednio: 11-30 μM [67], 109 μM [68] i 11-22 μM [69]. Warto zaznaczyć, że badania te wykorzystywały izolowane frakcje mikrosomalne lub CYP450 (2C19) uzyskane drogą ekspresji heterologicznej. Zasadne wydaje się założenie, że osiągnięcie podobnego stopnia hamowania CYP450 *in vivo* wymagałoby osiągnięcia co najmniej porównywalnych, jeśli nie wyższych stężeń polifenoli. Zatem stężenia tych związków wyraźnie przekraczałyby te, które wykazują efekt „anty-HOCl”. Ponownie, wydaje się zatem, że ów efekt ochronny przejawiałby się przed innymi, coraz mniej specyficznymi efektami wyższych stężeń polifenoli.

Należy zadać pytanie czy stężenia polifenoli wykazujące efekt „anty-HOCl” są osiągalne *in vivo*? Badania biodostępności Que, EGCG i Resv przy suplementacji doustnej wskazują jednoznacznie, że stężenia tych związków mierzone w osoczu zawierają się w zakresie stężeń nanomolowych [70-72]. Jednakże, nowe techniki suplementacji wykorzystujące nanocząsteczki, liposomy czy techniki dyspersyjne pozwalają na osiągnięcie w osoczu niskich mikromolowych stężeń polifenoli [73,74]. Biorąc pod uwagę, że prezentowane w opisywanej pracy wyniki zostały uzyskane przy specyficznych stężeniach HOCl, tj. takich, które wywoływały ~50% zahamowanie/stymulację danego aspektu hemostazy, zasadne jest założenie, że także niższe (w tym przypadku niskie mikromolowe) stężenia polifenoli będą chroniły przed odpowiednio niższymi – lecz wciąż istotnie wpływającymi na hemostazę – poziomami HOCl. W tym kontekście zastosowanie odpowiednich technik suplementacji mogłoby pozwolić na osiągnięcie

w osoczu stężeń polifenoli zapewniających ochronę hemostazy wobec naturalnie produkowanego HOCl, jednocześnie nie wpływających na hemostazę w sposób bezpośredni. Należy mieć jednak na uwadze, że nie wszystkie związki z tej grupy będą neutralizować efekt HOCl, czego przykładem jest Resv. Taki obraz sytuacji podkreśla rolę badań podstawowych i przesiewowych w poszukiwaniu odpowiednich kandydatów na związki osłaniające hemostazę przed reaktywnymi produktami stanu zapalnego.

Na podstawie uzyskanych wyników sformułowałem następujące wnioski:

1. Nadtlenoazotyn (ONOO^-) *per se* hamuje w sposób zależny od stężenia szybkość retrakcji skrzepu we krwi ludzkiej oraz wykazuje działanie synergistyczne z innym reaktywnym produktem stanu zapalnego – HOCl, co manifestuje się jako nasilone hamowanie retrakcji. Zatem, w przebiegu chorób związanych z przewlekłym lub ostrym stanem zapalnym, gdzie aktywowane komórki stanu zapalnego produkują znaczne ilości reaktywnych form tlenu, chloru i azotu, należy oczekiwać zaburzeń retrakcji.
2. ONOO^- promuje fibrylizę we krwi ludzkiej poprzez zahamowanie „oporności na fibrylizę zależnej od płytek krwi”. Może to stwarzać ryzyko przedwczesnego rozpuszczenia skrzepu i krwawienia przy jednoczesnym odsłonięciu wciąż trombogenicnej powierzchni uszkodzonego naczynia.
3. Siła hamowania przez ONOO^- poszczególnych odpowiedzi płytek krwi zależy od stężenia stresora. Podatność poszczególnych odpowiedzi na działanie ONOO^- układała się następująco: retrakcja skrzepu (najbardziej wrażliwa, $\text{IC}_{50} = 75 \mu\text{M}$) > sekrecja ($\text{IC}_{50} = 100 \mu\text{M}$) > odpowiedź prokoagulacyjna ($\text{IC}_{50} = 150 \mu\text{M}$). Retrakcja skrzepu jest zatem najczulszym na działanie ONOO^- elementem „oporności na fibrylizę zależnej od płytek krwi” i w warunkach stanu zapalnego jej zahamowanie będzie realizowało się już przy relatywnie niskich stężeniach stresora.
4. Należy spodziewać się, że nasilona produkcja ONOO^- w ostrych/przewlekłych stanach zapalnych może stwarzać ryzyko zakrzepowo-zatorowe (zahamowana retrakcja zwiększa ryzyko tromboembolizmu), ale także ryzyko przedwczesnej lizy zakrzepu. Mogło by to dodatkowo osłabić jego właściwości mechaniczne i przyczynić się do zwiększonego ryzyka zarówno

oderwania zakrzepu i embolizacji naczynia jak i krwawienia z niezreperowanego, a przedwcześnie odsłoniętego miejsca uszkodzenia naczynia.

5. Klinicznie istotne (mikromolowe) stężenia HOCl, mogą w sposób istotny hamować retrakcję skrzepu, co sugeruje rolę HOCl w patogenezie epizodów zakrzepowych obserwowanych w przebiegu niektórych chorób o podłożu zapalnym. Istotnie statystycznie hamowanie retrakcji we krwi ludzkiej obserwowano już przy stężeniu HOCl wynoszącym 50 μM . Ustalonym mechanizmem wpływu HOCl na retrakcję skrzepu jest hamowanie produkcji energii w mitochondriach płytek krwi.

6. HOCl hamował, w sposób statystycznie istotny, fibrylizę we krwi ludzkiej począwszy od stężenia 125 μM . Obserwowana silna redukcja szybkości fibrylizy w obecności HOCl wynika z wpływu tej reaktywnej formy chloru na fibrynogen, co przekłada się na zmienioną architekturę fibryny, w kierunku gęściejszej struktury bardziej odpornej na lizę. Efekt HOCl na fibrylizę nie wynika z wpływu na płytki krwi ani na osoczowe czynniki fibrynolityczne.

7. Wpływ ONOO⁻ i HOCl na fibrylizę jest przeciwstawny, zatem spodziewane jest wzajemne maskowanie tego efektu w warunkach jednoczesnej produkcji obu stresorów.

8. Naturalne polifenole pochodzenia roślinnego, takie jak: kwercetyna, gallusan epigallokatechiny i resweratrol – w stężeniach co najmniej dwukrotnie niższych niż te, które mogą *per se* hamować agregację płytek krwi – skutecznie chronią przed szkodliwymi efektami HOCl na hemostazę osoczną – szczególnie na strukturę skrzepu i szybkość fibrylizy. Co istotne, kwercetyna (10-50 μM) i gallusan epigallokatechiny (25-100 μM) chronią przed efektem HOCl zarówno w obecności płytek jak i przy ich absencji (normalizując powstawanie agregatów płytkowych w warunkach przepływu we krwi pełnej oraz strukturę skrzepu i fibrylizę w osoczu), zaś resweratrol (≥ 10 μM) wykazuje efektywne działanie „anty-HOCl” w osoczu ubogopłytkowym, zaś w obecności płytek krwi (krew pełna lub osocze bogatopłytkowe) nasila on hamujący wpływ HOCl wobec płytek.

IV Podsumowanie

Opisany powyżej cykl prac przedstawiający zróżnicowany wpływ badanych przede wszystkim reaktywnych związków na hemostazę poszerza naszą wiedzę o relacji pomiędzy stanem zapalnym, a hemostazą o nowe, przedstawione powyżej aspekty, oraz wskazuje na możliwość wystąpienia w stanach zapalnych zagrożeń związanych z nieefektywną retrakcją i osłabioną fibrynolizą, takich jak zwiększone ryzyko zakrzepowo-zatorowe. Obserwacje te potwierdziły badania przeprowadzone na krwi pobranej od pacjentów z astmą, chorobą, w której stan zapalny i związany z nim stres oksydacyjny (zatem i produkcja ONOO^- i HOCl) są spodziewane (**Załącznik nr 4, poz. II, pkt. 4B, pozycje 1 i 4**).

Wartość poznawcza uzyskanych wyników obejmuje:

1. Odkrycie komórkowego mechanizmu hamowania retrakcji skrzepu przez HOCl , opierającego się na hamowaniu metabolizmu energetycznego płytek krwi [**H.1**]
2. Ustalenie, że za zmienioną architekturę skrzepu i spowolnioną fibrynolizę w obecności HOCl odpowiada jego działanie na fibrynogen [**H.3**]
3. Uzyskanie wiedzy o zróżnicowanej wrażliwości poszczególnych odpowiedzi płytek i aspektów hemostazy na działanie klinicznie istotnych stężeń HOCl i ONOO^- [**H.1-H.3**]
4. Wskazanie, że ONOO^- hamuje „zależną od płytek krwi oporność na fibrynolizę” – promując tym samym fibrynolizę – wraz ze wskazaniem komórkowego mechanizmu tego oddziaływania (obejmującego wpływ ONOO^- na retrakcję skrzepu, sekrecję płytkową i odpowiedź prokoagulacyjną płytek krwi) [**H.2**]
5. Ustalenie, że ONOO^- i HOCl mogą wykazywać działanie synergistyczne względem jednych aspektów hemostazy (wspólne hamowanie retrakcji skrzepu) podczas gdy inne, (tj. architektura skrzepu i fibrynoliza) mogą być modulowane przez omawiane reaktywne związki w sposób przeciwstawny [**H.1-H.3**]
6. Obserwacja, że polifenole roślinne, ale nie wszystkie, mogą chronić przed szkodliwym wpływem HOCl na hemostazę, co wskazuje na ważkość odpowiednio zaprojektowanych badań

podstawowych i przesiewowych podczas poszukiwania związków o aktywności „anty-HOCl” [H.4].

Implikacje praktyczne i perspektywy:

1. Zidentyfikowanie (części) komórkowych i molekularnych podstaw oddziaływania HOCl i ONOO⁻ na hemostazę co przybliży perspektywę opracowania skutecznych strategii farmakologicznych redukujących niekorzystny efekt podwyższonych (toksycznych) stężeń tych produktów stanu zapalnego.
2. Podkreślenie roli zahamowanej retrakcji skrzepu oraz zmienionej struktury skrzepu i fibrynolizy jako czynników ryzyka zakrzepowo-zatorowego mogących nasilać się w stanach zapalnych.
3. Wskazanie potencjalnie diagnostycznej wartości pomiaru kinetyki retrakcji skrzepu, jako prostej, czulej i taniej metody, pozwalającej na ocenę zmienionej reaktywności płytek krwi w stanie zapalnym, których celem jest ocena ryzyka wystąpienia tromboembolizmu.
4. Wyniki zawarte w cyklu prac przedstawionych do oceny, stanowią podstawę do podjęcia badań nad normalizacją zaburzeń hemostazy przez wybrane polifenole z udziałem pacjentów z astmą i innymi chorobami o podłożu zapalnym, a związanymi ze zwiększonym ryzykiem występowania epizodów zakrzepowo-zatorowych.

V. Piśmiennictwo

1. Gale AJ. Current Understanding of Hemostasis. *Toxicol Pathol.* 2011; 39: 273–280
2. Heemskerk JW, Bevers EM, Lindhout T. Platelet activation and blood coagulation. *Thromb Haemost.* 2002; 88:186-93.
3. de Witt SM, Verdoold R, Cosemans JM, Heemskerk JW. Insights into platelet-based control of coagulation. *Thromb Res* 2014; 133: S139–48.
4. Rosing J, Tans G, Govers-Riemslog JW, Zwaal RF, Hemker HC. The role of phospholipids and factor Va in the prothrombinase complex. *J Biol Chem.* 1980; 255(1):274-83.
5. Lentz BR. Exposure of platelet membrane phosphatidylserine regulates blood coagulation. *Prog Lipid Res.* 2003; 42(5):423-38.
6. Peshkova AD, Minh GL, Tutwiler V, Andrianova IA, Weisel JW, Litvinov RI. Activated Monocytes Enhance Platelet-Driven Contraction of Blood Clots via Tissue Factor Expression. *Scientific Reports* volume 7, Article number: 5149 (2017)

7. Ono A, Westein E, Hsiao S, Nesbitt WS, Hamilton JR, Schoenwaelder SM, Jackson SP. Identification of a fibrin-independent platelet contractile mechanism regulating primary hemostasis and thrombus growth. *Blood*. 2008;112(1):90-9.
8. Tucker KL, Sage T, Gibbins JM. Clot retraction. *Methods Mol Biol* 2012; 788:101–7.
9. Brass LF, Diamond SL. Transport physics and biorheology in the setting of hemostasis and thrombosis. *J Thromb Haemost*. 2016; 14, 906–17
10. Tutwiler V, Peshkova AD, Minh GL, Zaitsev S, Litvinov RI, Cines DB, Weisel JW. Blood clot contraction differentially modulates internal and external fibrinolysis. *J Thromb Haemost*. 2019; 17(2):361-70
11. Misztal T., Przesław K., Rusak T. Tomasiak M. Peroxynitrite - altered platelet mitochondria - a new link between inflammation and hemostasis. *Thrombosis Research*. 2013; 131(1): e17-e25
12. Misztal T., Rusak T., Tomasiak M. Peroxynitrite may affect clot retraction in human blood through the inhibition of platelet mitochondrial energy production. *Thrombosis Research*. 2014; 133(3): 402-411
13. Peshkova AD, Malyasyov DV, Bredikhin RA, Minh GL, Izabella A. Andrianova IA, et al. Reduced Contraction of Blood Clots in Venous Thromboembolism Is a Potential Thrombogenic and Embologenic Mechanism. *TH Open*. 2018; 2(1): e104–e115.
14. Chernysh IN, Nagaswami C, Kosolapova S, Peshkova AD, Cuker A, et al. The distinctive structure and composition of arterial and venous thrombi and pulmonary emboli. *Sci Rep*. 2020; 10: 5112.
15. Bryk-Wiązania AH, Undas A. Hypofibrinolysis in type 2 diabetes and its clinical implications: from mechanisms to pharmacological modulation. *Cardiovasc Diabetol*. 2021;20(1):191
16. Kim SC, Schneeweiss S., Liu J, Solomon DH. The Risk of Venous Thromboembolism in Patients with Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Care Res (Hoboken)*. 2013; 65(10): 1600–1607.
17. Zöller B, Pirouzifard M, Memon AA, Sundquist J, Sundquist K. Risk of pulmonary embolism and deep venous thrombosis in patients with asthma: a nationwide case-control study from Sweden. *Eur Respir J*. 2017;49(2):1601014.
18. Levi M., van der Poll T., Buller H.R. Bidirectional relation between inflammation and coagulation. *Circulation*. 2004;109:2698-2704.
19. Wagner D.D. New links between inflammation and thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25(7):1321-4.
20. K. Yamamoto, D.J. Loskutoff, Fibrin deposition in tissues from endotoxin-treated mice correlates with decreases in the expression of urokinase-type but not tissue-type plasminogen activator, *J. Clin. Invest*. 1996; 97: 2440–2451
21. Pacher P, Beckman JS, Liaudet L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev*. 2007;87(1):315-424.
22. Misztal T, Rusak T, Tomasiak M. Clinically relevant HOCl concentrations reduce clot retraction rate via the inhibition of energy production in platelet mitochondria. *Free Radical Research*. 2014; 48(12): 1443-1453.
23. Nguyen GT, Green ER, Meccas J-Neutrophils to the ROScues: Mechanisms of NADPH Oxidase Activation and Bacterial Resistance. *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, 2017;7:373

24. Thomas EL, Grisham MB, Jefferson MM. Myeloperoxidase-dependent effect of amines on functions of isolated neutrophils. *J. Clin. Investig.* 1983, 72, 441–454.
25. Weiss SJ. Tissue destruction by neutrophils. *N. Engl. J. Med.* 1989, 320, 365–376.
26. Lin H, Levison BS, Buffa JA, Huang Y, Fu X, et al. Myeloperoxidase-mediated protein lysine oxidation generates 2-aminoadipic acid and lysine nitrile in vivo. *Free Radic Biol Med.* 2017;104:20-31.
27. Whiteman M, Rose P, Siau JL, Cheung NS, Tan GS, et al. Hypochlorous acid-mediated mitochondrial dysfunction and apoptosis in human hepatoma HepG2 and human fetal liver cells: role of mitochondrial permeability transition. *Free Radic Biol Med.* 2005 Jun 15;38(12):1571-84.
28. Podrez EA, Abu-Soud HM, Hazen SL. Myeloperoxidase-generated oxidants and atherosclerosis. *Free Radic Biol Med.* 2000;28:1717–1725.
29. Malech HL, Gallin JI. Current concepts: immunology. Neutrophils in human diseases. *N Engl J Med* 1987;317:687–694.
30. Malle E, Buch T, Grone HJ. Myeloperoxidase in kidney disease. *Kidney Int* 2003;64:1956–1967.
31. Himmelfarb J, McMenamin ME, Loseto G, Heinecke JW. Myeloperoxidase-catalyzed 3-chlorotyrosine formation in dialysis patients. *Free Radic Biol Med* 2001;31:1163–1169.
32. Stief TW, Kurz J, Doss MO, Fareed J. Singlet oxygen inactivates fibrinogen, factor V, factor VIII, factor X, and platelet aggregation of human blood. *Thromb Res* 2000;97:473–480.
33. Murina MA, Saveleva EL, Roshchupkin DI. Mechanism of action of biogenic chloramines and hypochlorite on initial aggregation of blood platelets. *Biofizika* 2006;51:299–305
34. Zamora R, Vodovotz Y, Billiar TR. Inducible Nitric Oxide Synthase and Inflammatory Diseases. *Molecular Medicine.* 2000;6:347–373
35. Koppenol WH. The basic chemistry of nitrogen monoxide and peroxyxynitrite. *Free Radic Biol Med.* 1998;25:385-91.
36. Szabo C, Ischiropoulos H, Radi R. Peroxyxynitrite: biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics. *Nature Reviews Drug Discovery.* 2007;6:662-80
37. McLean S, Bowman LA, Sanguinetti G, Read RC, Poole RK. Peroxyxynitrite toxicity in *Escherichia coli* K12 elicits expression of oxidative stress responses and protein nitration and nitrosylation. *J.Biol.Chem.* 2010; 285: 20724–20731.
38. Ischiropoulos H, Zhu L, Beckman JS, Peroxyxynitrite formation from macrophage-derived nitric oxide. *Arch Biochem Biophys.* 1992;298:446–451.
39. Lupidi G, Angeletti M, Eleuteri AM, Tacconi L, Coletta M, Fioretti E. Peroxyxynitrite-mediated oxidation of fibrinogen inhibits clot formation. *FEBS Lett.* 1999;462(3):236-
40. Nielsen VG, Crow JP, Zhou F, Parks DA. Peroxyxynitrite Inactivates Tissue Plasminogen Activator. *Anesthesia & Analgesia.* 2004;98(5):1312-1317.
41. Rusak T., Tomasiak M., Ciborowski M. Peroxyxynitrite can affect platelet responses by inhibiting energy production. *Acta Biochim Pol.* 2006;53(4):769-76.
42. Osdoit S, Rosa J-P. Fibrin clot retraction by human platelets correlates with $\alpha_{IIb}\beta_3$ integrin-dependent protein tyrosine dephosphorylation. *J Biol Chem.* 2001;273:6703-10.

43. de Witt, S. M., Swieringa, F., Cavill, R., Lamers, M. M. E., van Kruchten, R., Mastenbroek, T., et al. Identification of platelet function defects by multi-parameter assessment of thrombus formation. *Nat. Commun.* 2014;5:4257.
44. Wolberg AS. Thrombin generation and fibrin clot structure. *Blood Rev.* 2007;21(3):131-42.
45. Krajewski S, Kurz J, Wendel HP, Straub A. Flow cytometry analysis of porcine platelets: optimized methods for best results. *Platelets.* 2012;23(5):386-94.
46. Søfteland E, Framstad T, Thorsen T, Holmsen H. Porcine platelets in vitro and in vivo studies: relevance to human thrombosis research. *Eur J Haematol.* 1992;49(4):161-73. \
47. Kilksen H, Holme S, Murphy S. Platelet metabolism during storage of platelet concentrates at 22 degrees C. *Blood.* 1984;64(2):406-14.
48. Guppy M, Abas L, Arthur PG, Whisson ME. The Pasteur effect in human platelets: implications for storage and metabolic control. *Br J Haematol.* 1995;91(3):752-7.
49. Zuo L, Koozechian MS, Chen LL. Characterization of reactive nitrogen species in allergic asthma. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2014; 112:18–22.
50. Majoor CJ, Kamphuisen PW, Zwinderman AH, Ten Brinke A, Amelink M, Rijssen-beek-Nouwens L et al. Risk of deep-vein thrombosis and pulmonary embolism in asthma. *Eur Respir J.* 2013;42:655–661
51. Kunitada S, Fitzgerald GA, Fitzgerald DJ. Inhibition of clot lysis and decreased binding of tissue-type plasminogen activator as a consequence of clot retraction, *Blood* 1992;79:1420–1427.
52. Weisel JW, Litvinov RI. The biochemical and physical process of fibrinolysis and effects of clot structure and stability on the lysis rate, *Cardiovasc. Hematol. Agents Med. Chem* 2008;6:161–180.
53. Carrieri C, Galasso R, Semeraro F, Ammollo CT, Semeraro N, Colucci M. The role of thrombin activatable fibrinolysis inhibitor and factor XI in platelet-mediated fibrinolysis resistance: a thromboelastographic study in whole blood, *J. Thromb. Haemost.* 2011;9:154–162.
54. Rijken DC, de Willige SU. Inhibition of fibrinolysis by coagulation factor XIII, *Bio Med Res. Int.* 2017 (2017) 1209676
55. DiMarco T, Giulivi C, Current analytical methods for the detection of dityrosine, biomarker of oxidative stress, in biological samples, *Mass Spectrom. Rev.* 2007;26 (1):108–20
56. Zöller B, Pirouzifard M, Memon AA, Sundquist J, Sundquist K, Risk of pulmonary embolism and deep venous thrombosis in patients with asthma: a nation-wide case-control study from Sweden, *Eur. Respir. J.* 2017;49(2): pii: 1601014
57. Monteseirín J, Bonilla I, Camacho J, Conde J, Sobrino F, et al. Elevated secretion of myeloperoxidase by neutrophils from asthmatic patients: the effect of immunotherapy, *J. Allergy Clin. Immunol.* 2001;107(4): 623–626
58. Mita H, Higashi N, Taniguchi M, Higashi A, Kawagishi Y, Akiyama K. Urinary 3-bromotyrosine and 3-chlorotyrosine concentrations in asthmatic patients: lack of increase in 3-bromotyrosine concentration in urine and plasma proteins in aspirin-induced asthma after intravenous aspirin challenge, *Clin. Exp. Allergy* 2004;34(6): 931–938

59. Marumo M, Ekawa K, Wakabayashi I. Resveratrol inhibits Ca²⁺ signals and aggregation of platelets. *Environ. Health Prev. Med.*2020;25, 70.
60. Shen MY, Hsiao G, Liu CL, Fong TH, Lin KH, Chou DS, Sheu JR. Inhibitory mechanisms of resveratrol in platelet activation: Pivotal roles of p38 MAPK and NO/cyclic GMP. *Br. J. Haematol.*2007;139, 475–485.
61. Jackson SP, Nesbitt WS, Kulkarni S. Signaling events underlying thrombus formation. *J. Thromb. Haemost.* 2003;1:1602–1612
62. Golebiewska EM, Poole AW. Secrets of platelet exocytosis—What do we really know about platelet secretion mechanisms? *Br. J. Haematol.* 2014;165:204–216.
63. Brüne B, Ullrich V. Different calcium pools in human platelets and their role in thromboxane A₂ formation. *J. Biol. Chem.*1991;266:19232–19233
64. Marcinczyk N, Golaszewska A, Misztal T, Gromotowicz-Poplawska A, Rusak T, Chabielska E. New approaches for the assessment of platelet activation status in thrombus under flow condition using confocal microscopy. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*2020;393, 727–738
65. Misztal T, Golaszewska A, Branska-Januszewska J, Marcinczyk N, Chabielska E, Tomasiak M, Rusak T. HAuCl₄, putative general aquaporins blocker, reduces platelet spreading, filopodia formation, procoagulant response, and thrombus formation under flow. *Front. Physiol.*2020;11, 1025
66. Siller-Matula J, Schrör K, Wojta J, Huber K. Thienopyridines in cardiovascular disease: Focus on clopidogrel resistance. *Thromb. Haemost.*2007;97:385–393
67. Elbarbry F, Ung A, Abdelkawy K. Studying the inhibitory effect of quercetin and thymoquinone on human cytochrome P450 enzyme activities. *Pharmacogn Mag.* 2017;13:S895–S899.
68. Misaka S, Kawabe K, Onoue S, Werba JP, Giroli M, et al. Effects of green tea catechins on cytochrome P450 2B6, 2C8, 2C19, 2D6 and 3A activities in human liver and intestinal microsomes. *Drug Metab. Pharmacokinet.* 2013;28:244–249
69. Orsini F, Verotta L, Klimo K, Gerhäuser C. Synthesis of resveratrol derivatives and in vitro screening for potential cancer chemopreventive activities. *Arch. Pharm. (Weinheim)*2016;349:414–427
70. Gambini J, Inglés M, Olaso G, Lopez-Gruoso R, Bonet-Costa V, et al. Properties of resveratrol: In vitro and in vivo studies about metabolism, bioavailability, and biological effects in animal models and humans. *Oxid. Med. Cell. Longev.*2015;2015, 837042.
71. Burak C, Brüll V, Langguth P, Zimmermann BF, Stoffel-Wagner B, et al. Higher plasma quercetin levels following oral administration of an onion skin extract compared with pure quercetin dihydrate in humans. *Eur. J. Nutr.*2017;56:343–353.
72. Cai Z-Y, Li X-M, Liang J-P, Xiang L-P, Wang K-R, et al. Bioavailability of tea catechins and its improvement. *Molecules.* 2018;23:2346
73. Chen W, Zou M, Ma X, Lv R, Ding T, Liu D. Co-encapsulation of EGCG and quercetin in liposomes for optimum antioxidant activity. *J. Food Sci.*2019;84, 111–120
74. Peñalva R, Morales J, González-Navarro CJ, Larrañeta E, Quincoces G, et al. Increased oral bioavailability of resveratrol by its encapsulation in casein nanoparticles. *Int. J. Mol. Sci.* 2018;19:2816.

5. Informacja o wykazaniu się istotną aktywnością naukową realizowaną w więcej niż jednej uczelni lub instytucji naukowej, w szczególności zagranicznej.

5a. Osiągnięcia naukowo-badawcze przed uzyskaniem stopnia doktora

Badania prowadzone w ramach pracy doktorskiej dotyczyły wpływu nadtlenoazotynu (ONOO^-) na retrakcję skrzepu i fibrylizę oraz poszukiwanie mechanizmu takich oddziaływań. Badania zostały przeprowadzone na modelu krwi wieprzowej oraz ludzkiej, zaś wyniki zaprezentowane na konferencji krajowej w formie posteru (**Załącznik nr 4, poz. II, pkt. 7A pozycja 1**), a następnie opublikowane jako *Misztal T., Przesław K., Rusak T. Tomasiak M. Peroxynitrite - altered platelet mitochondria - a new link between inflammation and hemostasis. Thrombosis Research. 2013; 131(1): e17-e25. (Załącznik nr 4, poz. II, pkt. 4A, pozycja 1a)*. Wykazano, że ONOO^- , w sposób zależny od stężenia, zmniejsza szybkość retrakcji skrzepu i zwiększa końcową objętość obkurzonego skrzepu (IC_{50} w krwi pełnej = 200 μM , w osoczu bogatopłytkowym [PRP] = 100 μM , w układzie rekonstruowanym [płytki płukane + fibrynogen] = 25 nM). Widoczna jest zależność siły hamowania retrakcji od ilości potencjalnych celów dla stresora w środowisku reakcji. Stężenia ONOO^- hamujące retrakcję w PRP hamowały również konsumpcję tlenu przez płytki krwi, nasilały produkcję mleczanu (świadcząca o zachodzeniu efektu Pasteura) i obniżały całkowity poziom ATP w płytkach. W zawieszynie płytek płukanych, ONOO^- indukował spadek wartości mitochondrialnego potencjału transbłonowego, będącego warunkiem koniecznym do zachodzenia fosforylacji oksydacyjnej. Powyższe obserwacje świadczą o zahamowaniu produkcji energii w mitochondriach płytkowych. Potwierdzenie tego założenia przyniosły obserwacje, że retrakcja skrzepu jest wysoce czuła na obecność inhibitorów oddychania mitochondrialnego, zaś zahamowanie glikolizy nie wpływało istotnie na szybkość obkurczania skrzepu. Fibrylizacja w osoczu była odporna na działanie ONOO^- , zaś liza skrzepów fibrynowo-płytkowych była istotnie przyspieszana przez ONOO^- , jak i przez inhibitory aparatu kurczliwego (np. cytochalazynę) i inhibitory produkcji energii. Pomiarzy tromboelastometryczne wykazały, że ONOO^- zmniejsza wartość parametrów opisujących stabilność mechaniczną skrzepu (*maximal clot firmness*, MCF i *maximal clot elasticity*, MCE). Konkludując, klinicznie istotne stężenia ONOO^- mogą hamować szybkość retrakcji skrzepu, redukować jego mechaniczną stabilność oraz przyspieszać fibrylizę na drodze hamowania produkcji energii przez mitochondria płytek krwi. Wg najlepszej wiedzy autora, jest to pierwsze doniesienie

eksperymentalne o związku pomiędzy statusem energetycznym płytek krwi, a kinetyką retrakcji skrzepu i fibrynolizy. Obserwacja ta jest istotna gdyż wysoka wrażliwość mitochondriów płytkowych na – mogący pojawiać się w stanie zapalnym w relatywnie wysokich stężeniach – ONOO⁻ czyni zaburzenia retrakcji i fibrynolizy (a co za tym idzie i stabilności skrzepu) bardzo prawdopodobne w sytuacjach patologicznych. Tym samym mitochondria płytkowe mogą być rozważane jako nowy łącznik pomiędzy stanem zapalnym i hemostazą.

Druga praca o wpływie ONOO⁻ na retrakcję skrzepu – wykorzystując model krwi ludzkiej – została opublikowana w 2014 roku jako *Misztal T., Rusak T., Tomasiak M. Peroxynitrite may affect clot retraction in human blood through the inhibition of platelet mitochondrial energy production. Thrombosis Research. 2014; 133(3): 402-411. (Załącznik nr 4, poz. II, pkt. 4A, pozycja 2a).*

Wyniki przeprowadzonych badań pozwalają stwierdzić, że klinicznie istotne stężenia ONOO⁻ mogą hamować szybkość retrakcji skrzepu i zwiększać końcową objętość obkurzonego skrzepu (IC₅₀ w krwi pełnej = 120 μM, w osoczu bogatopłytkowym [PRP] = 75 μM, w układzie rekonstruowanym [płytki płukane + fibrynogen] = 25 nM). Hamowanie retrakcji przez ONOO⁻ było związane z redukcją produkcji energii przez płytkowe mitochondria (o czym świadczyły pomiary konsumpcji tlenu, produkcji mleczanu, pomiaru całkowitego ATP i mitochondrialnego potencjału transbłonowego), nie wykazano natomiast zahamowania polimeryzacji aktyny (niezbędnej do wytworzenia funkcjonalnego aparatu kurczliwego) i nitrowania tyrozyny (modyfikacja reszt tyrozyny przez ONOO⁻, mogąca przyczyniać się do modulowania szlaków sygnałnych) w zakresie stężeń ONOO⁻ hamujących retrakcję. Pomiary tromboelastometryczne wskazały na zmniejszoną stabilność i elastyczność skrzepów wytwarzanych w obecności ONOO⁻. Uzyskane wyniki sugerują, że zmienione przez ONOO⁻ mitochondria płytek krwi reprezentują nowy łącznik pomiędzy stanem zapalnym, a hemostazą także we krwi ludzkiej. Reasumując, klinicznie istotne stężenia ONOO⁻, pojawiające się we krwi w ostrych i chronicznych stanach zapalnych, mogą prowadzić do zaburzeń mitochondrialnej produkcji energii w płytkach krwi, co przekłada się na nieefektywną pracę ich aparatu kurczliwego i zahamowaną retrakcję skrzepu.

Powyższe prace były inspiracją i podstawą do kolejnych, ujętych w osiągnięciu przedstawionym do oceny.

Przed uzyskaniem stopnia doktora pełniłem rolę kierownika 4 projektów oraz rolę wykonawcy 5 projektów finansowanych przez Uniwersytet Medyczny w Białymstoku. Wykaz projektów znajduje się w **Załączniku nr 4** natomiast dokumenty potwierdzające pełnienie roli wykonawcy/kierownika znajdują się w **Załączniku nr 7** dokumentacji.

5b. Osiągnięcia naukowo-badawcze po uzyskaniu stopnia doktora

Po obronie pracy doktorskiej kontynuowałem badania nad wpływem reaktywnych produktów stanu zapalnego na hemostazę. Wynikiem tych działań jest cykl prac stanowiących osiągnięcie naukowe przedstawione niniejszym do oceny (cykl prac **H.1 – H.4**) oraz prace, w których opisano zahamowanie retrakcji skrzepu i fibrynolizy we krwi pobranej od pacjentów chorych na astmę, stanowiących przykład choroby z przewlekłym stanem zapalnym. Inne moje zainteresowania naukowe obejmowały m.in. badanie roli akwaporyn w odpowiedziach płytek krwi, poszukiwanie czynników regulujących aktywność prokoagulacyjną płytek krwi, poszukiwanie mechanizmu modulowania hemostazy przez naturalne substancje pochodzenia roślinnego i grzybowego, czy też badanie roli metabolitów tryptofanu w rozwoju ryzyka zakrzepowo-zatorowego.

Badania opublikowane wcześniej (**Załącznik nr 4, poz. II, pkt. 4A, pozycja 1a i 2a**) oraz doniesienia o podwyższonej produkcji reaktywnych form azotu (np. ONOO⁻) i chloru (np. HOCl) w przebiegu astmy skłoniły Zakład Chemii Fizycznej do podjęcia **współpracy z Kliniką Alergologii i Chorób Wewnętrznych UMB** celem zbadania czy podobne – do obserwowanych *in vitro* – efekty, np. spowolniona retrakcja czy zmieniona struktura skrzepu i fibrynoliza, będą obserwowane również we krwi pobranej od pacjentów z permanentnym stanem zapalnym i podwyższonym ryzykiem zatorowości płucnej, tj. astmą.

Badania opublikowane jako *Tomasiak-Łozowska MM., Rusak T., Misztal T., Bodzenta-Lukaszyk A., Tomasiak M. Reduced clot retraction rate and altered platelet energy production in patients with asthma. Journal of Asthma. 2016; 53(6): 589-598* (**Załącznik nr 4, poz. II, pkt. 4B, pozycja 1**), przeprowadzono na grupach: 41 pacjentów nie leczonych wziewnymi kortykosteroidami, 40 pacjentów przyjmujących wziewne kortykosteroidy i 50

zdrowych ochotników. Badania wykazały, że jedynie w grupie przyjmującej kortykosteroidy stwierdzono nieznacznie nasilone krzepnięcie (pomiar tromboelastometryczny). Obie grupy pacjentów charakteryzowały się istotnie ($p < 0,05$) zmniejszoną szybkością retrakcji skrzepu, większą zawartością tlenku azotu (NO) w wydychanym powietrzu, obniżoną spirometrią, zwiększoną liczbą eozynofili w osoczu i nasiloną produkcją mleczanu przez płytki krwi. Spowolniona retrakcja była obserwowana także w układzie zawierającym wyizolowane płytki z krwi i zawieszony w sztucznym środowisku zawierającym fibrynogen. Dowodzi to, że przyczyną tak zmienionej retrakcji jest osłabiona kurczliwość płytek krwi, a nie ewentualne zmiany w składzie osocza czy liczby komórek. W całej badanej populacji (pacjenci i zdrowi ochotnicy) szybkość retrakcji skrzepu korelowała pozytywnie ze spirometrią ($r = 0,668$; $p < 0,001$), a negatywnie z poziomem wydychanego NO ($r = -0,543$; $p < 0,001$), liczbą eozynofili ($r = -0,367$; $p < 0,002$) i produkcją mleczanu przez płytki ($r = -0,791$; $p < 0,001$). Szybkość retrakcji nie korelowała ze spirometrią, ani z liczbą eozynofili w grupie pacjentów przyjmujących wziewne kortykosteroidy, zaś we wszystkich grupach produkcja mleczanu korelowała negatywnie ze spirometrią ($r = -0,659$; $p < 0,001$) oraz pozytywnie z wydychanym NO ($r = 0,576$; $p < 0,001$). Przedstawione wyniki są zbieżne z hipotezą zakładającą, że u pacjentów z astmą, reaktywne formy azotu powstające w płucach (jak NO i powstający z niego ONOO⁻) mogą przyczyniać się do zmniejszonej wydajności produkcji energii w mitochondriach płytek krwi (o czym świadczy nasilona produkcja mleczanu poprzez efekt Pasteura) i w rezultacie do zredukowanej kurczliwości płytek i zahamowanej retrakcji skrzepu. Występowanie zaburzonej retrakcji może predysponować pacjentów z astmą do tromboembolizmu, np. zatorowości płucnej. Obecnie stosowane leki przeciwzakrzepowe i przeciwplatekcyjne wydają się nie mieć potencjału terapeutycznego w normalizacji zaburzeń retrakcji wywołanej przez reaktywne produkty stanu zapalnego.

Celem badań, których wyniki zostały opublikowane jako Tomasiak-Łozowska MM., Misztal T., Rusak T., Brańska-Januszewska J., Bodzenta-Łukaszyk A., Tomasiak M. *Asthma is associated with reduced fibrinolytic activity, abnormal clot architecture, and decreased clot retraction rate. Allergy. 2017; 72(2): 314-319 (Załącznik nr 4, poz. II, pkt. 4B, pozycja 4)* było zbadanie czy u pacjentów z astmą można zaobserwować zmiany w strukturze skrzepu i szybkości fibrynolizy oraz jakie czynniki mogą leżeć u podstawy takich zmian. Badania zostały przeprowadzone krwi

pobranej od 34 zdrowych ochotników i 36 pacjentów z astmą, nieprzyjmujących wziewnych kortykosteroidów. W porównaniu do zdrowych ochotników, u pacjentów z astmą zaobserwowano znacząco ($p < 0,001$) zredukowaną: szybkość retrakcji skrzepu, szybkość fibrylizacji (pomiar tromboelastometryczny) i spirometrię. Istotnie zwiększone były: poziom NO w wydychanym powietrzu, liczbę eozynofili, osoczowe stężenie inhibitora fibrylizacji PAI-1 i czynnika sieciującego fibrynę (czynnik XIII) oraz gęstość skrzepu. U pacjentów z astmą, szybkość fibrylizacji korelowała negatywnie z gęstością skrzepu ($r = -0,519$; $p < 0,001$), stężeniem czynnika XIII ($r = -0,711$; $p < 0,001$), stężeniem PAI-1 ($r = -0,472$; $p < 0,001$), poziomem wydychanego NO ($r = -0,59$; $p < 0,001$) i liczbą eozynofili ($r = -0,419$; $p < 0,01$), zaś pozytywna korelacja była obserwowana pomiędzy szybkością fibrylizacji, a spirometrią ($r = 0,558$; $p < 0,001$). Gęstość skrzepu była pozytywnie skorelowana z poziomem czynnika XIII ($r = 0,398$; $p < 0,05$). Szybkość retrakcji skrzepu korelowała negatywnie z poziomem wydychanego NO ($r = -0,554$; $p < 0,001$) i poziomem czynnika XIII ($r = -0,658$; $p < 0,001$), pozytywnie zaś ze spirometrią ($r = 0,505$; $p < 0,001$). Przedstawione w tej pracy wyniki sugerują, że przebieg astmy związany jest ze zmniejszoną szybkością retrakcji skrzepu i zredukowanym potencjałem fibrynolitycznym, na który wpływ mają zarówno zmieniona architektura skrzepu (gęściejsza u pacjentów z astmą niż u zdrowych ochotników) jak i podwyższone stężenie czynników osoczowych – inhibitora aktywatora plazminogenu typu 1 (PAI-1) oraz czynnika sieciującego fibrynę (czynnik XIII). Powyższe zmiany były związane z podwyższonym poziomem NO w wydychanym powietrzu (marker stanu zapalnego w płucach) i zmniejszoną spirometrią (świadcząca o zmianach strukturalnych w płucach). Podsumowując, zmniejszony potencjał fibrynolityczny obserwowany u pacjentów z astmą, wraz ze zmniejszoną szybkością retrakcji skrzepu może częściowo tłumaczyć zwiększone ryzyko zatorowości płucnej (związanej z tromboembolizmem).

Interesujących wyników dostarczyły badania **we współpracy z Zakładem Histologii i Embriologii UMB** nad rolą akwaporyn (AQP, kanałów wodnych) w procesie aktywacji płytek krwi opublikowane jako *Misztal T., Rusak T., Brańska-Januszewska J., Gąsowska M., Szynaka B., Golaszewska A., Bruczek M., Tomasiak M. Aquaporins in human platelets: intracellular localization and possible role in granule and lysosome secretion. Acta Biochimica Polonica. 2018; 65(4): 555-566. (Załącznik nr 4, poz. II, pkt. 4B, pozycja 7)*. Akwaporyny odpowiadają za szybki transport cząsteczek wody w odpowiedzi na pojawienie się gradientu osmotycznego po

obu stronach błony komórkowej w konsekwencji transportu jonów do, lub z komórki, za co odpowiadają kanały i wymiennicze jonowe. Punktem wyjścia do podjęcia badań były obserwacje, że płytki, w bardzo krótkim czasie po aktywacji, pobierają znaczne ilości wody (i towarzyszących soli) co wydaje się odgrywać istotną rolę w zmianach w obrębie błony plazmatycznej (rozciąganie błony, zmiana rozkładu fosfolipidów w obrębie dwuwarstwy), pęcznieniu (zarówno całej płytki krwi jak i ziarnistości wydzielniczych) i wykształcaniu filopodiów. Ponadto, potwierdzono obecność AQP1 i AQP7 w ludzkich płytkach krwi, a pozbawienie płytek tych AQPs skutkowało zredukowaną agregacją (w odpowiedzi na adrenalinę) i odpowiedzią prokoagulacyjną (w przypadku płytek mysich). Wiedza o roli AQPs w biologii płytek krwi jest jednak niekompletna. Uzyskane wyniki pozwoliły stwierdzić, że płytki krwi mogą wykazywać ekspresję wielu izoform AQPs (immunodetekcja przy użyciu poliklonalnych przeciwciał dała łącznie 12 różnych pozytywnych wyników), które były zlokalizowane w błonie plazmatycznej płytek jak i w błonie ziarnistości sekrecyjnych. Stosując klasyczny, niespecyficzny inhibitor AQPs (HAuCl₄) stwierdzono, że zablokowanie AQPs znacząco hamuje pobór wody przez płytki stymulowane kolagenem, monenzyną (jonofor sodowy, budujący gradient osmotyczny poprzez zwiększenie poziomu sodu w cytozolu), bądź umieszczone w środowisku hipotonicznym (200 mOsm/kg). Co więcej, stężenia HAuCl₄ tożsame z tymi, które hamowały pobór wody przez płytki, hamowały całkowicie sekrecję z wszystkich typów ziarnistości wydzielniczych (lizosomy oraz ziarnistości gęste i alfa) obecnych w płytkach, indukowaną przez szeroki panel agonistów fizjologicznych i farmakologicznych. Jednocześnie, wykluczono, że efekt działania inhibitora może wynikać z indukowania toksycznych efektów względem płytek, jak uszkodzenia błony komórkowej czy utlenianie grup -SH w białkach. Podsumowując, wyniki opublikowane w opisywanej pracy sugerują obecność większej ilości izoform AQPs w płytkach krwi niż dotychczas sądzono. Szybki napływ wody przez AQPs zlokalizowane w błonie plazmatycznej mogą stanowić żywotny mechanizm w adaptacji płytek do zmieniających się warunków osmotycznych w osoczu. Z kolei AQPs znajdujące się w błonie ziarnistości wydzielniczych mogą pełnić rolę w pęcznieniu ziarnistości co ułatwiałoby ich fuzję z błoną plazmatyczną i uwolnienie zmagazynowanego ładunku. Uzyskane wyniki sugerują, że zablokowanie AQPs w płytkach krwi może hamować sekrecję indukowaną przez najsilniejszy fizjologiczny induktor egocytozy płytkowej – trombinę. Warto wspomnieć, że żaden z obecnie

stosowanych leków przeciwplatek nie jest w stanie zahamować sekrecji indukowanej trombiną, której znaczne ilości mogą być generowane w wyniku oderwania blaszki miażdżycowej i odsłonięcia bogatego w czynnik tkankowy rdzenia zmiany miażdżycowej. W świetle licznych doniesień o witalnej roli sekrecji platekowej w procesie wytwarzaniu zakrzepów, można założyć, że dalsze badania nad rolą AQPs w biologii platek krwi mogą skutkować opracowaniem nowych leków przeciwplatekowych opartych o mechanizm specyficznego hamowania sekrecji platekowej.

Kontynuacją powyższych badań były badania realizowane w ramach projektu **MINIATURA 1 („Akwaporyny - nowy potencjalny punkt uchwytu dla leków przeciwplatekowych” (2017/01/X/NZ3/00338), w którym pełniłem rolę kierownika.**

Celem projektu była weryfikacja hipotezy zakładającej, że związki hamujące napływ wody do komórek przez akwaporyny (AQPs, białkowe kanały wyspecjalizowane w szybkim transporcie wody przez błony komórkowe) mogą wykazywać działanie przeciwplatekowe. Podstawą tak sformułowanej hipotezy były obserwacje, że aktywowane plateki krwi pobierają bardzo szybko znaczne ilości wody z otoczenia (osocza) co przejawia się zmianami morfologicznymi obserwowanymi podczas adhezji (rozciąganie błony plateki krwi, aby pokryć jak największą powierzchnię), sekrecji (pęcznienie i fuzja ziarnistości sekrecyjnych), agregacji (wytwarzanie filopodiów, ułatwiających kontakt pomiędzy agregującymi platekami) i odpowiedzi prokoagulacyjnej (wytwarzanie balonopodobnych struktur z napęczniałej błony plazmatycznej aktywowanych platek, z silną ekspresją prokoagulacyjnej fosfatydyloseryny). Dotychczas zidentyfikowano w platekach krwi dwie izoformy AQPs – AQP1 oraz AQP7 oraz sugeruje się możliwość istnienia wielu innych (dotychczas u ssaków zidentyfikowano 13 izoform AQPs). Hamowanie szybkiego napływu wody (i towarzyszących jonów) z osocza do cytoplazmy plateki krwi poprzez zablokowanie akwaporyn mogłoby zatem potencjalnie ograniczać każdy etap tworzenia zakrzepu zależny od platek krwi.

Warto zaznaczyć, że wszystkie stosowane obecnie leki przeciwplatekowe blokują etap agregacji platek krwi. W szczególnych sytuacjach, jak oderwanie blaszki miażdżycowej, pojawienie się relatywnie dużej ilości trombiny (silny aktywator platek) w wyniku ekspresji czynnika tkankowego na powierzchni odsłoniętego rdzenia miażdżycowego, może wywołać tak

silną sekrecję z płytek krwi, że pojawienie się dużej ilości wtórnych aktywatorów płytek przeważa nad zdolnością leku do zahamowania agregacji płytek. Potencjalnie, związki blokujące akwaporyny (obecne w błonie ziarnistości sekrecyjnych) mogłyby hamować pęcznienie ziarnistości – zjawisko obserwowane w trakcie zachodzenia sekrecji – i redukować proces wydzielania nawet w warunkach gdzie lokalne stężenie agonisty płytkowego jest wysokie, a klasyczne leki przeciwplatekcyjne tracą skuteczność.

Zatem, celem moich badań było wytypowanie kandydatów na przyszłe leki, które byłyby w stanie zahamować sekrecję płytkową nawet w przypadku bardzo silnej stymulacji płytek krwi, a tym samym wypełnić istniejącą lukę wśród leków przeciwplatekcyjnych.

W ramach badania przetestowano kilkanaście uznanych i domniemych inhibitorów AQPów o różnej budowie cząsteczkowej. Uzyskane wyniki pozwalają postawić wniosek, że spośród przebadanych związków najbardziej obiecującymi kandydatami na inhibitory AQPów w płytkach krwi są związki (tak organiczne jak i nieorganiczne) zawierające atom złota (jedno- lub trzywartościowego): auranofin, aufen i kwas tetrachlorozłotowy. Związki te najskuteczniej hamowały pęcznienie płytek krwi wywołane hipotonią, sekrecję z różnych typów ziarnistości płytkowych i odpowiedź prokoagulacyjną płytek. Także formowanie agregatów płytkowych w warunkach przepływu było istotnie zredukowane. Co warto podkreślić, badane związki nie zmniejszały adhezji płytek do powierzchni pokrytych kolagenem (stanowiących model uszkodzenia naczynia krwionośnego), ale ograniczały – bezpośrednio zależne od sekrecji płytkowej – osadzanie się kolejnych warstw aktywowanych płytek na początkowej monowarstwie (zadherowanej do kolagenu) oraz w znacznym stopniu redukowały powstawanie powierzchni prokoagulacyjnej na tychże płytkach. Warto podkreślić, że stężenia związków zbliżone do tych, które hamowały sekrecję i odpowiedź prokoagulacyjną, wpływały na kinetykę formowania skrzepów fibrynowo-płytkowych, zmniejszając dynamikę ich narastania. W tym kontekście należy ocenić, że blokery akwaporyn w płytkach krwi mogą wykazywać właściwości zarówno przeciwplatekcyjne, jak i antyprokoagulacyjne.

Perspektywicznie, wytypowanie efektywnych inhibitorów AQPów pozwoliłoby na kontrolowanie sekrecji płytkowej, co mogłoby przełożyć się nie tylko na zredukowanie ryzyka zatorowości powiązanej z nadmierną aktywacją płytek krwi, ale też pozwolić na modulowanie innych niż hemostaza procesów fizjologicznych i patologicznych, w których zaangażowane są

płytki krwi, a bardziej precyzyjnie – związki biologicznie aktywne uwalniane przez zaktywowane płytki. Oprócz doniosłej roli w hemostazie płytki krwi biorą udział w takich procesach jak: regeneracja tkanek (w tym gojenie ran), odpowiedź immunologiczna (poprzez pobudzanie leukocytów) czy przerzutowanie nowotworowe i angiogeneza. Procesy te mogą przebiegać dzięki bezpośrednim interakcjom płytka krwi-inna komórka (w czym pośredniczą czynniki wyniesione podczas sekrecji z błon ziarnistości na błonę plazmatyczną płytki) lub poprzez parakrynną regulację aktywności komórek uczestniczących w w/w procesach przez czynniki uwolnione podczas sekrecji płytkowej do osocza. Dysponując narzędziem do hamowania sekrecji płytkowej możliwe stałoby się zatem modulowanie szeregu procesów fizjologicznych, co jest niezwykle istotne z poznawczego (lepiej poznanie roli sekrecji płytkowej w tym procesach) jak i klinicznego punktu widzenia (w perspektywie wykorzystania hamowania sekrecji płytkowej w strategiach terapeutycznych).

Podsumowując, realizacja projektu pozwoliła postawić pozytywną odpowiedź na pytanie czy inhibitory AQP mogą potencjalnie być nowym punktem uchwytu dla leków przeciwplateletowych oraz (2) wyselekcjonować efektywne *in vitro* blokery plateletowych AQP, przydatne do dalszych badań na modelu zwierzęcym. Dodatkowo, przeprowadzone badania dostarczyły informacji na temat wpływu na hemostazę związków złota obecnie znajdujących się na etapie badań klinicznych pod kątem terapii przeciwnowotworowej (auranofin <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03456700>).

Wyniki badań przeprowadzone we współpracy z **Zakładem Biofarmacji i Radiofarmacji UMB** zostały opublikowane jako *Misztal T., Golaszewska A., Brańska-Januszewska J., Marcińczyk N., Chabielska E., Tomasiak M., Rusak T. HAuCl₄, putative general aquaporins blocker, reduces platelet spreading, filopodia formation, procoagulant response, and thrombus formation under flow. *Frontiers in Physiology*. 2020; 11: 16 pp., Article ID 1025. (Załącznik nr 4, poz. II, pkt. 4B, pozycja 12) oraz prezentowane na międzynarodowej konferencji w formie wystąpienia ustnego nagrodzonego jako najlepsza prezentacja ustna w swoim panelu (Załącznik nr 4, poz. II, pkt. 7B, pozycja 16).*

Uzyskane wyniki wskazują, że zablokowanie AQPs w ludzkich płytkach krwi silnie hamuje zmiany morfologiczne płytek takie jak wykształcanie wypustek błony (jak lamellipodia i filopodia) oraz „balonopodobnych” struktur określanych jako najbardziej prokoagulacyjne

(bogate w fosfatydyloserynę, PS) formy morfologiczne płytek krwi. Co więcej, płytki krwi eksponowane na inhibitor AQP_s wykazywały znacznie słabszą odpowiedź prokoagulacyjną (mierzoną cytometrycznie jako poziom ekspresji PS na powierzchni błony i zrzucanie prokoagulacyjnych mikropęcherzyków oraz jako generacja trombiny zależna od płytek krwi) w odpowiedzi na aktywację kolagenem niż płytki bez zahamowanych AQP_s. Redukcja prokoagulacyjnych właściwości płytek miała odzwierciedlenie w wynikach pomiarów kinetyki krzepnięcia metodą tromboelastometryczną. Zablokowanie AQP_s skutkowało silną redukcją tworzenia agregatów płytkowych na powierzchni pokrytej kolagenem w warunkach przepływu (powstawała jedynie monowarstwa płytek zadherowanych do kolagenu) – nie obserwowano natomiast hamowania samej adhezji płytek do powierzchni trombogenicnej. Formowanie agregatów było przywracane poprzez dodanie egzogenego ADP, co sugeruje, że przyczyną braku formowania agregatów płytkowych w warunkach przepływu, w obecności blokera AQP_s może być zahamowana sekrecja (niezbędna do aktywacji kolejnych napływających płytek i w rezultacie do osadzania kolejnych warstw płytek na pierwotnej monowarstwie). Pomiar ekspresji markerów sekrecji płytkowej (CD63 i P-selektyny) potwierdziły to przypuszczenie. Badania przyżyciowe z wykorzystaniem mikroskopii konfokalnej i mysiego modelu zakrzepicy indukowanej FeCl₃ wykazały, że podanie inhibitora AQP_s (w dawce 1-10 mg/kg) przekłada się na redukcję rozmiaru zakrzepów oraz zmniejszenie liczby płytek eksponujących PS w obrębie takich zakrzepów. Konkluzją płynącą z opisywanej pracy jest ustalenie, że AQP_s są w ludzkich płytkach krwi zaangażowane w zmiany morfologiczne wywołane agonistą, jak również w formowanie agregatów w warunkach przepływu (poprzez ich rolę w sekrecji płytkowej) i wykształcanie odpowiedzi prokoagulacyjnej. Przeciwwzakrzepowy efekt obserwowany *in vivo*, w mysim modelu zakrzepicy, sugeruje, że nietoksyczne inhibitory AQP_s mogą być potencjalnymi kandydatami na nową klasę leków przeciwplatekcyjnych.

Inne badania, w które byłem zaangażowany, dotyczyły roli metabolitów tryptofanu: kwasu chinolinowego (QA) oraz siarczanu indoksyli (IS) – których podwyższone stężenia korelują z ryzykiem zakrzepowo-zatorowym w chorobach nerek – na hemostazę. U pacjentów z chroniczną chorobą nerek dochodzi do akumulacji toksyn mocznicowych, które – jak się przypuszcza – stanowią jeden z czynników przekładających się na blisko 20-krotny wzrost ryzyka zakrzepowo-zatorowego u takich pacjentów. Dokładny wpływ IS oraz QA na hemostazę

wciąż jednak jest niedostatecznie poznany. Badania, prowadzone **we współpracy z Zakładem Farmakodynamiki UMB**, których rezultaty zostały opublikowane jako *Karbowska M., Kamiński T., Marcińczyk N., Misztal T., Rusak T., Smyk Ł., Pawlak D. The uremic toxin indoxyl sulfate accelerates thrombotic response after vascular injury in animal models. Toxins. 2017; 9(7): Article ID 229, 15 pp. (Załącznik nr 4, poz. II, pkt. 4B, pozycja 2)* oraz jako *Karbowska M., Kamiński T.W., Znorko B., Domaniewski T., Misztal T., Rusak T., Pryczynicz A., Guzińska-Ustymowicz K., Pawlak K., Pawlak D. Indoxyl sulfate promotes arterial thrombosis in rat model via increased levels of complex TF/VII, PAI-1, platelet activation as well as decreased contents of SIRT1 and SIRT3. Frontiers in Physiology. 2018; 9: article 1623, 12 pp (Załącznik nr 4, poz. II, pkt. 4B, pozycja 6)* wskazują, że IS, przy podaniu ostrym (w dawkach 10-100 mg/kg/24h) zwiększa ($p < 0,001$) zależnie od dawki masę zakrzepu indukowanego prądem elektrycznym u szczurów Wistar. Co więcej, IS (dawki 30 i 100 mg/kg/24h) nasilał formowanie zakrzepów u myszy w doświadczalnym modelu zakrzepicy indukowanej laserem ($p < 0,01$). Jedynie najwyższa dawka (100 mg/kg) nasilała formowanie skrzepu w pomiarach tromboelastometrycznych, co wyrażało się jako skrócenie czasu krzepnięcia i wzrost parametru MCF, opisującego mechaniczną stabilność skrzepu. IS nie wpływał na morfologię krwi ani na oporność osmotyczną erytrocytów, natomiast nasilał agregację płytek indukowaną kolagenem. Co więcej, przy chronicznej ekspozycji na IS (szczury Wistar przez 28 dni piły wodę zawierającą IS w dawkach 100 i 200 mg/kg/24h), obserwowano w osoczu zwiększoną ilość kompleksów czynnik tkankowy/czynnik VII krzepnięcia, jak również wzrost stężenia inhibitora aktywatora plazminogenu typu 1 (PAI-1), co wskazuje nie tylko na nasilone tendencje zakrzepowe, ale i na spowolnioną fibrynolizę. Reasumując, ekspozycja szczurów na IS skutkuje nasileniem pierwotnej hemostazy (związanej z aktywacją płytek krwi i tworzeniem agregatów) jak i hemostazy wtórnej, manifestującej się nasileniem tworzenia fibryny i spowolnieniem fibrynolizy. Wyniki te wskazują, że IS jest zaangażowany w wykształcanie stanu prozakrzepowego i manifestującego się jako nasilone tworzenie zakrzepów i ich zwiększoną mechaniczną stabilność. Może to częściowo tłumaczyć nasilone ryzyko zakrzepowo-zatorowe obserwowane u pacjentów z chroniczną chorobą nerek.

Interesujące, że druga z najpowszechniej występujących toksyn mocznicowych – kwas chinolinowy (QA) nie wykazywała takiego potencjału prozakrzepowego co IS. Badania, których

wyniki opublikowano jako Leszczyńska A., Misztal T., Marcińczyk N., Kamiński T., Kramkowski K., Chabielska E., Pawlak D. *Effect of quinolinic acid - A uremic toxin from tryptophan metabolism - On hemostatic profile in rat and mouse thrombosis models. Advances in Medical Sciences. 2019; 64(2): 370-380. Załącznik nr 4, poz. II, pkt. 4B, pozycja 9* oraz jako Leszczyńska A., Kamiński T., Misztal T., Pawlak D. *Quinolinic acid does not influence coagulation profile, nor fibrinolytic activity, under physiological conditions in rats. Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research. 2019 : 76, 5, s. 863-871. (Załącznik nr 4, poz. II, pkt. 4B, pozycja 10)* zostały podjęte aby zweryfikować hipotezę zakładającą, że QA może partycypować w wykształcaniu prozakrzepowego fenotypu, obserwowanego u pacjentów z chorobami nerek. Wykazano, że *in vitro* QA (w zakresie stężeń 0,1 – 2 mM) nie wpływał na parametry opisujące kinetykę formowania skrzepu we krwi pełnej (oceniającą tromboelastometrycznie) oraz na agregację płytek krwi indukowaną kolagenem. Obserwowano natomiast umiarkowane hamowanie agregacji indukowanej ADP. Badania *ex vivo* przeprowadzone na krwi pobranej od szczurów Wistar przyjmujących QA (w dawkach 3, 10 i 30 mg/kg/24h) w wodzie pitnej przez 14 dni pozwoliły stwierdzić, że QA nie wpływał na dynamikę formowania skrzepu ani na fibrynolizę. Badania przyżyciowe przeprowadzone w eksperymentalnych modelach zakrzepicy u transgenicznym myszy z ekspresją białka GFP (szczep C57BL/6-Tg(CAG-EGFP)10sb/J) i szczurów Wistar przyjmujących QA przez 14 dni w wodzie pitnej pozwoliły stwierdzić, że obserwowany wpływ QA, bądź jego brak, zależą od modelu doświadczalnego. Szczurzy model zakrzepicy indukowanej prądem elektrycznym nie wykazywał zmian pomiędzy szczurami przyjmującymi QA, a szczurami kontrolnymi w takich aspektach jak masa zakrzepu czy parametry krzepnięcia w osoczu. Z kolei w mysim modelu zakrzepicy indukowanej laserem obserwowano istotny wzrost masy zakrzepu przy dawce QA 30 mg/kg/24h. Odwrotnie, przy podaniu dożylnym QA (30 mg/kg) redukowało wielkość indukowanych laserowo zakrzepów, co korelowało ze wzrostem ekspresji molekuly adhezyjnej PECAM-1, cząstki o aktywności antyagregacyjnej. Na podstawie powyższych badań można stwierdzić, że ustalenie roli QA w wykształcaniu prozakrzepowego fenotypu obserwowanego w przebiegu chronicznej choroby nerek stanowi wyzwanie metodyczne. Na obecną chwilę rola QA jako czynnika ryzyka zakrzepowo-zatorowego pozostaje niezwerifikowana.

Jednym ze szczególnie interesujących mnie zagadnień jest identyfikacja czynników regulujących odpowiedź prokoagulacyjną płytek krwi, a zatem mogących uczestniczyć w powstawaniu stanu patologicznej nadkrzepliwości. Wyniki opublikowane jako *Baaten C.C.F.M.J., Swieringa F., Misztal T., Mastenbroek T.G., Feijge M.A.H., Bock P.E., Donners M.M.P.C., Collins P.W., Li R., van der Meijden P.E.J., Heemskerk J.W.M. Platelet heterogeneity in activation-induced glycoprotein shedding: functional effects. Blood Advances; 2018; 2(18): 2320-2331.* (**Załącznik nr 4, poz. II, pkt. 4B, pozycja 5**), powstały podczas mojej wizyty stażowej na Uniwersytecie w Maastricht w zespole Prof. Johana Heemskerka (w okresie wrzesień-październik 2015). Na czas pobytu w Maastricht zostałem oficjalnym członkiem Cardiovascular Research Institute Maastricht (CARIM), a podwójna afiliacja (CARIM i UMB) została uwzględniona we wspólnej publikacji w *Blood Advances*, oficjalnym periodyku American Heart Association (ASH). Oprócz możliwości prowadzenia badań z wiodącą w świecie grupą badawczą zajmującą się fizjologią i biochemią płytek krwi, miałem także możliwość zaprezentowania własnych wyników z pracy doktorskiej, które spotkały się z zainteresowaniem i pozytywnym odbiorem. Szczegółowym celem wizyty było poznanie techniki flow-chamber (ang. komora przepływowa) w stopniu umożliwiającym samodzielne przygotowanie, wykonanie i interpretację eksperymentu oraz skonstruowanie własnej komory przepływowej i implementację techniki w moim stałym miejscu pracy. Technika ta (znana także jako „thrombus formation under flow”) polega na analizie powstawania agregatów płytkowych (w modelu *ex vivo/in vitro*) na powierzchni trombogenicnej w warunkach reologicznych symulujących te naturalnie występujące w naczyniach krwionośnych. Powyższe założenia zostały w pełni zrealizowane, a technika flow-chamber znalazła szerokie zastosowanie w badaniach prowadzonych przez Zakład Chemii Fizycznej UMB (**H.3, H.4, Załącznik nr 4, poz. II, pkt. 4B, pozycje 11-14**).

Opublikowane wyniki wspólnych badań dotyczyły wpływu zrzucania receptorów powierzchniowych (konkretnie glikoproteiny Ib i glikoproteiny VI) na właściwości – w tym prokoagulacyjne – płytek krwi. Wspomniane glikoproteiny są kluczowe w procesie formowania skrzepu, stanowią one bowiem receptory dla czynnika von Willebranda (GP Ib, jako składnik większego receptora) i dla kolagenu (GP VI), kluczowych białek adhezyjnych, obecnych w warstwie podśródbłonkowej w miejscu uszkodzenia naczynia krwionośnego. Badania

potwierdziły, że za zrzucanie (proteolityczne odcinanie) GP Ib i GP VI odpowiadają metaloproteinazy z rodziny ADAM (konkretnie izoformy ADAM10 i ADAM17) oraz, że jest to proces zależny od wzrostu cytozolowego stężenia jonów wapnia i aktywacji kinaz z rodziny kinazy białkowej C. Drugą możliwą ścieżką prowadzącą do zrzucania GP Ib i GP VI jest aktywacja kaspaz, a zatem ścieżka apoptotyczna. Płytki krwi, które osiągnęły niski stopień ekspresji (na drodze zrzucenia) GP Ib i GP VI wykazywały osłabione właściwości adhezyjne, zaś nasilone były u takich płytek: powierzchniowa ekspresja fosfatydyloseryny (PS), wiązanie czynników krzepnięcia, generacja trombiny i formowanie fibryny. Te przejawy aktywności prokoagulacyjnej były efektywnie hamowane przez inhibicję ADAM10/17. Pomiary wykonane na płytkach krwi pobranych od pacjenta z syndromem Scotta (płytki krwi tych pacjentów mają niesprawny mechanizm odpowiadający za ekspresję PS) pozwoliły stwierdzić, że zrzucanie receptorów (*via* ADAM10/17) nie wymaga uprzedniej ekspresji PS do efektywnego zachodzenia. Podsumowując, w płytkach krwi funkcjonują dwie ścieżki aktywacji ADAM10/17, co skutkuje proteolitycznym zrzucaniem receptorów adhezyjnych GP Ib i GP VI i obraniem przez płytki krwi fenotypu prokoagulacyjnego kosztem zmniejszenia ich właściwości adhezyjnych. Modulowanie procesu zrzucania receptorów poprzez hamowanie aktywności ADAM10/17 może zatem stanowić potencjalny mechanizm kontroli nad aktywnością prokoagulacyjną płytek krwi.

Wyniki przeprowadzone we **współpracy z Zakładem Biologii UMB** i opublikowane jako *Rusak T., Misztal T., Rusak M., Brańska-Januszewska J., Tomasiak M. Involvement of hyperglycemia in the development of platelet procoagulant response: the role of aldose reductase and platelet swelling. Blood Coagulation & Fibrinolysis. 2017; 28(6): 443-451 (Załącznik nr 4, poz. II, pkt. 4B, pozycja 3)* zostały przeprowadzone aby zweryfikować hipotezę zakładającą, że w warunkach hiperglikemii powstający w płytkach krwi sorbitol (osmotycznie aktywny alkohol wielohydroksylowy) może pośredniczyć we wzroście objętości płytek (pęcznieniu), co przekładałoby się na ich zwiększoną reaktywność, także w kontekście odpowiedzi prokoagulacyjnej. Wykazano, że inkubacja płytek krwi w glukoza (> 10 mM) prowadzi do wewnątrzpłytkowej akumulacji sorbitolu, co korespondowało ze zwiększeniem średniej objętości płytek. Zmiany te zbiegały się z nasileniem agregacji, sekrecji i ekspresji PS na powierzchni płytek aktywowanych kolagenem. Powyższe zmiany były normalizowane przez sorbinil, inhibitor reduktazy aldozowej (enzym katalizujący konwersję glukozy do sorbitolu). Pomiary

tromboelastometryczne zarejestrowały, że próbki krwi pełnej eksponowane na glukozę charakteryzują się zwiększoną dynamiką krzepnięcia, co było także normalizowane przez sorbinil, ale również przez winkrystynę, czynnik destabilizujący mikrotubule. Obserwacje w mikroskopie fluorescencyjnym pozwoliły ustalić, że płytki eksponowane na hiperglikemię charakteryzują się większym stopniem polimeryzacji tubuliny (większą zawartością mikrotubul), co ponownie było znoszone przez sorbinil i winkrystynę. Na podstawie uzyskanych wyników można sformułować wniosek, że hiperglikemia jest związana z aktywacją w płytkach krwi reduktazy aldozowej, co prowadzi do akumulacji sorbitolu i zwiększenia objętości płytek, co w rezultacie skutkuje nasileniem odpowiedzi prokoagulacyjnej płytek krwi. Przekłada się to na zwiększoną generację trombiny i stan nadkrzepliwości. W świetle uzyskanych wyników reduktaza aldozowa może stanowić potencjalny punkt uchwytu dla leków przeciwprokoagulacyjnych, zmniejszających ryzyko zakrzepowo-zatorowe w przebiegu cukrzycy i innych stanów związanych z hiperglikemią.

Badania, których wyniki opublikowano jako *Gromotowicz-Popławska A., Marcińczyk N., Misztal T., Golaszewska A., Aleksiejczuk M., Rusak T., Chabielska E. Rapid effects of aldosterone on platelets, coagulation, and fibrinolysis lead to experimental thrombosis augmentation. Vascular Pharmacology. 2019; 122-123: Article number: 106598, 11pp (Załącznik nr 4, poz. II, pkt. 4B, pozycja 8)* skupione były na znalezieniu odpowiedzi na pytanie czy aldosteron – hormon kory nadnerczy zaangażowany w regulację gospodarki wodno-mineralnej organizmu – może indukować szybkie (pomijające zmiany w profilu ekspresji genów) zmiany w aktywności osocznego układu krzepnięcia, płytek krwi i układu fibrynolitycznego, przyczyniać się tym samym do rozwinięcia stanu nadkrzepliwości. Badania przeprowadzono w układzie *ex vivo* oraz przyżyciowym modelu zakrzepicy indukowanej prądem elektrycznym na szczurach Wistar oraz w dwóch eksperymentalnych modelach zakrzepicy u transgenicznym myszy z ekspresją białka GFP (szczep C57BL/6-Tg(CAG-EGFP)10sb/J). Wykazano, że podanie szczurom aldosteronu (30 µg/kg) dożylnie wiąże się ze zwiększeniem gęstości sieci fibryny (rejestrowanej w mikroskopie konfokalnym) oraz zahamowaniem fibrynolizy (pomiaru tromboelastometryczne), mierzonych we krwi pobranych od zwierząt. Efekt ten był widoczny już 10 minut po podaniu aldosteronu i był znoszony w obecności antagonisty receptora mineralokortykosteroidowego (MR, którego agonistą jest aldosteron) – eplerenonu. Co więcej, w modelach mysich, ostre

podanie aldosteronu (100 µg/kg) korelowało ze zwiększoną akumulacją płytek w miejscu uszkodzenia naczynia laserem oraz z istotnym przyrostem ilości płytek krwi ekspozujących fosfatydyloserynę w modelu zakrzepicy indukowanej FeCl₃, co było znoszone przez eplerenon. Uzyskane wyniki sugerują, że aldosteron wywiera silny wpływ na płytki krwi, powodując wzrost ich reaktywności, a także nasila formowanie fibryny oraz przyczynia się do zahamowania fibrynolizy. Normalizujący wpływ eplerenonu pozwala przypuszczać, że za część efektów odpowiada pobudzenie receptora MR przez aldosteron. Sugeruje to istnienie innych niż genomowe ścieżek sygnałnych, których efekty obserwowalne są już kilka minut po ostrym podaniu aldosteronu. Dalsza eksploracja mechanizmów, poprzez które aldosteron wpływa na powstanie stanu nadkrzepliwości – z istotnym udziałem płytkowej odpowiedzi prokoagulacyjnej – pozwolą lepiej zrozumieć rolę tego hormonu w patogenezie chorób naczyniowo-sercowych, jednocześnie stawiając receptor MR jako potencjalny punkt uchwytu leków przeciwplatek.

Wyniki opublikowane jako *Gołaszewska A., Misztal T., Marcińczyk N., Chabielska E., Rusak T. Adrenaline may contribute to prothrombotic condition via augmentation of platelet procoagulant response, enhancement of fibrin formation, and attenuation of fibrinolysis. Frontiers in Physiology. 2021; 12: 31 pp., Manuscript ID: 657881 (Załącznik nr 4, poz. II, pkt. 4B, pozycja 14)* przedstawiają kompleksową ocenę wpływu fizjologicznych (niskich nanomolowych) stężeń adrenaliny na hemostazę ze szczególnym uwzględnieniem odpowiedzi prokoagulacyjnej płytek krwi. Badania te stanowiły także treść rozprawy doktorskiej Pani Agaty Gołaszewskiej pt. „Ocena wpływu adrenaliny na aktywność płytek krwi zdrowych ochotników” (obronionej w 2021), w której pełniłem funkcję promotora pomocniczego. Adrenalina, hormon należący do amin katecholowych produkowany w korze nadnerczy i regulujący m.in. reakcje na stres czy poziom glukozy we krwi, jest uważana za czynnik ryzyka zakrzepowo-zatorowego, jednak dokładny komórkowy i molekularny mechanizm jej wpływu pozostaje nie do końca poznany. Wykazano, że adrenalina (1-10 nM) jest w stanie wzmacniać odpowiedzi płytek ekspozowanych na podprogowe stężenia kolagenu, nie wywołujące *per se* odpowiedzi płytek. Przejawiało się to w nasilonej agregacji, sekrecji, zwiększonym formowaniu agregatów na powierzchni trombogenicnej w warunkach przepływu, wzroście ekspresji fosfatydyloseryny (PS) na powierzchni płytek i większej dynamice formowania skrzepów fibrynowo-płytkowych w próbach, gdzie płytki były ekspozowane na adrenalinę. Zwiększeniu ulegała nie tylko populacja

płytek eksponujących PS, ale również skróceniu ulegał czas potrzebny do pełnej ekspresji PS. Wzrost ekspresji PS (odpowiedzi prokoagulacyjnej) na powierzchni płytek korespondował z powstawaniem gęściejszej sieci fibryny i wzrostem oporności takich struktur na fibrylizację. Prokoagulacyjny efekt kombinacji nanomolowych stężeń adrenaliny i kolagenu był normalizowany przez antagonistę receptora α_2 -adrenergicznego – rauwolscynę (co potwierdza, że za obserwowane efekty adrenaliny odpowiadają receptory zlokalizowane na płytkach krwi), jak i przez związki reprezentujące najczęściej stosowane farmakologiczne strategie przeciwplatekcyjne, tj. inhibitor cyklooksygenazy (kwas acetylosalicylowy), antagonistę glikoproteiny IIb/IIIa (tirofiban) i antagonistę receptora purynergicznego P2Y₁₂ (PSB 0739). Uzyskane wyniki wskazują, że rola adrenaliny w powstawaniu stanu nadkrzepliwości polega przede wszystkim na indukowaniu odpowiedzi prokoagulacyjnej płytek krwi, co przejawia się nasiloną produkcją trombiny, powstawaniem struktury fibryny o zwiększonej gęstości i w rezultacie spowolnioną fibrylizacją. Strategie oparte na ograniczeniu wpływu adrenaliny na płytki poprzez blokowanie receptora α_2 -adrenergicznego mogą być pożyteczne w kontrolowaniu stanu nadkrzepliwości w sytuacjach zwiększonego poziomu adrenaliny we krwi, wliczając w to podanie tego hormonu podczas szoku anafilaktycznego. Aktualne raporty sugerujące możliwość użycia relatywnie wysokich stężeń adrenaliny (liczonych w setkach nM) w normalizacji reaktywności płytek krwi u pacjentów przyjmujących leki przeciwplatekcyjne z grupy antagonistów receptorów P2Y₁₂ (np. kłopidogrel) powinny uwzględniać możliwy prokoagulacyjny efekt tej aminy katecholowej.

Badania nad naturalnymi, izolowanymi modulatorami hemostazy doprowadziły do lepszego poznania wpływu ekstraktu z *Potentilla erecta* (pięciornik kurze ziele, ang. *tormentil*), tradycyjnie stosowanego w stanach zapalnych, na hemostazę. Wyniki tych badań opublikowano jako *Marcińczyk N., Gołaszewska A., Gromotowicz-Popławska A., Misztal T., Strawa J., Tomczyk M., Kasacka I., Chabielska E. Multidirectional effects of tormentil extract on hemostasis in experimental diabetes. Frontiers in Pharmacology. 2021; 12: 16 pp, Article ID 682987 (Załącznik nr 4, poz. II, pkt. 4B, pozycja 15)*. Badania zostały przeprowadzone z użyciem myszy C57BL/6 i szczurów Wistar z cukrzycą indukowaną streptozotocyną (cytostatyk o silnym powinowactwie do komórek β trzustki), stanem, który charakteryzuje się nasiloną koagulacją i zmniejszoną szybkością fibrylizacji. Badania wykazały, że ekstrakt z pięciornika podawany w

wodzie pitnej przez 14 dni (100 mg/kg), powodował istotny spadek powierzchni zakrzepów w modelu zakrzepicy indukowanej laserem u myszy. Z drugiej strony, ekstrakt w dawce 200 mg/kg zwiększał masę zakrzepów w modelu zakrzepicy u szczura indukowanej prądem elektrycznym. Z kolei dawka 400 mg/kg wpływała na poprawę funkcji śródbłonna, co znajdowało odzwierciedlenie w zwiększonym przepływie tętniczym krwi, wydłużeniu czasu krwawienia i zgrubieniu ściany naczynia. Podsumowując, uzyskane wyniki sugerują wielotorowość wpływu ekstraktu z pięciornika na hemostazę w eksperymentalnym modelu indukowanej cukrzycy u myszy i szczurów. W zależności od dawki, ekstrakt może zmniejszać reaktywność płytek i poprawiać funkcje śródbłonna naczyń, a jednocześnie może nasilać aktywność układu krzepnięcia i tworzenie zakrzepu. Zależność obserwowanego efektu od użytego modelu badawczego powinna być uwzględniana w projektowaniu dalszych badań ekstraktu z *Potentilla erecta*.

Dotychczasowym wynikiem współpracy z zespołem dr hab. Magdaleny Jaszek z Zakładu Biochemii Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie, obejmującej prowadzenie wspólnych badań w obszarze biologii molekularnej i biochemii (w tym badanie wpływu biologicznie aktywnych preparatów z grzybów wyższych na komórkowe i molekularne aspekty procesu koagulacji krwi i fibrynolizy) jest publikacja *Stefaniuk D., Misztal T., Pięt M., Zajac A., Kopycińska M., Matuszewska A., Ruminowicz-Stefaniuk M., Matuszewski Ł., Marcińczyk N., Belcarz A., Żuchowski J., Skrabalak I., Grz M., Ciolek B., Paduch R., Jaszek M. Thromboelastometric analysis of anticancer *Cerrena unicolor* subfractions reveal their potential as fibrin glue drug carrier enhancers. Biomolecules. 2021; 11(9): 19 pp, Article ID 1263 (Załącznik nr 4, poz. II, pkt. 4B, pozycja 16)*. Badania dotyczyły wpływu dwóch subfrakcji wyizolowanych z sekretomu grzyba białej zgnilizny drewna – *Cerrena unicolor* (gmatówka szarawa), na formowanie fibryny, w kontekście potencjalnego zastosowania klejów fibrynowych, wspomagających leczenia ran. Wyniki analiz tromboelastometrycznych wskazały, że frakcja S6 (100-300 µg/ml) wspomaga tworzenie fibryny w układzie czysty fibrynogen + trombina, co przekładało się na wzrost dynamiki tworzenia fibryny, wzrost modułu sprężystości i stopnia usieciowania tak powstałej struktury. Frakcja S5 (100 µg/ml) *per se* nie wpływała na proces tworzenia fibryny, natomiast w obecności egzogennej fibryny wykazywała właściwości antyproliferacyjne przeciwko linii komórkowej HT-29 (linia komórkowa raka okrężnicy).

Fracja S6 oraz kombinacja S6+S5 hamowały aktywność modelowych metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej, co sugeruje właściwości antymetastatyczne tych frakcji. Podsumowując, niskocząsteczkowe frakcje izolowane z sekretomu *Cerrena unicolor* mogą wspomagać wytwarzanie klejów fibrynowych, zapewniając ich bardziej gęstą strukturę. Jednocześnie zademonstrowano, że przeciwproliferacyjne efekty badanych subfrakcji potencjalnie mogłyby zapewniać dodatkowy benefit z klejów fibrynowych formowanych w obecności tychże frakcji.

Pozostałe badania, w których brałem udział, nie dające się zaklasyfikować w osobne zbiory obejmowały:

1. Podsumowanie patofizjologicznych efektów wolnej hemoglobiny w pracy przeglądowej [Misztal T., Tomasiak M. *Patofizjologiczne konsekwencje hemolizy. Rola wolnej hemoglobiny. (Pathophysiological consequences of hemolysis. Role of cell-free hemoglobin).* Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej. 2011; 65: 627-639] (**Załącznik nr 4, poz. II, pkt. 4A, pozycja 2b**)
2. Zbadanie kinetyki retrakcji skrzepu i fibrynolizy u pacjentów z czerwienicą prawdziwą [Rusak T., Piszcz J., Misztal T., Brańska-Januszewska J., Tomasiak M. *Platelet-related fibrinolysis resistance in patients suffering from PV. Impact of clot retraction and isovolemic erythrocytapheresis. Thrombosis Research. 2014; 134(1): 192-198*] (**Załącznik nr 4, poz. II, pkt. 4A, pozycja 3a**)
3. Zbadanie relacji pomiędzy poziomem wolnej hemoglobiny w osoczu pacjentów z czerwienicą prawdziwą (polycythemia vera), a nadciśnieniem tętniczym [Rusak T., Misztal T., Piszcz J., Tomasiak M. *Nitric oxide scavenging by cell-free hemoglobin may be a primary factor determining hypertension in polycythemic patients. Free Radical Research. 2014; 48(2): 230-238*] (jednak **Załącznik nr 4, poz. II, pkt. 4A, pozycja 4a**)
4. Porównanie modelu *flow chamber* z modelami zakrzepicy indukowanej przyżyciowo w kontekście oceny reaktywności płytek krwi (praca metodyczna) [Marciniczyk N., Golaszewska A., Misztal T., Gromotowicz-Popławska A., Rusak T., Chabielska E. *New approaches for the assessment of platelet activation status in thrombus under flow condition using confocal*

microscopy. Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology. 2020; 393(4):727-738.]

(Załącznik nr 4, poz. II, pkt. 4B, pozycja 11)

5. Ocenę użyteczności ekspresji płytkowej molekuly adhezyjnej PECAM-1 w ewaluacji reaktywności płytek krwi [Marciniczyk N., Misztal T., Gromotowicz-Popławska A., Żebrowska A., Rusak T., Radziwon P., Chabielska E. *Utility of platelet endothelial cell adhesion molecule 1 in the platelet activity assessment in mouse and human blood. International Journal of Molecular Sciences. 2021; 22(17): 13 pp, Article ID 9611.*] **(Załącznik nr 4, poz. II, pkt. 4B, pozycja 13)**

6. **Wynikiem współpracy nawiązanej z grupą badawczą Prof. Artura Terzyka [Physicochemistry of Carbon Materials Research Group, Wydział Chemii Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu]** , dotyczącej zbadania biokompatybilności i cytotoksyczności nanomateriałów węglowych o potencjalnym zastosowaniu w stentach czy protezach naczyń krwionośnych jest na dzień dzisiejszy 1 praca oryginalna [Zięba M., Rusak T., Misztal T., Zięba W., Marciniczyk N., Czarnecka J., Al-Gharabli S., Kujawa J. , Terzyk A. *Nitrogen plasma modification boosts up the hemocompatibility of new PVDF-carbon nanohorns composite materials with potential cardiological and circulatory system implants application. Biomaterials Advances. 2022; 138: 13 pp, Article ID 212941.*] **(Załącznik nr 4, poz. II, pkt. 4B, pozycja 17).**

Moje aktualne i przyszłe plany badawcze dotyczą kolejnych aspektów relacji pomiędzy stanem zapalnym, a hemostazą, ze szczególnym uwzględnieniem roli zewnątrzkomórkowych pułapek neutrofilowych (NETs) jako modulatorów hemostazy. NETs można zdefiniować jako eksternalizowaną zdekondensowaną chromatynę neutrofila bogatą w białka pochodzenia jądrowego (np. histony) oraz cytozolowego (np. elastaza i mieloperoksydaza) o silnie przeciwbakteryjnych właściwościach. Sieć tworzona przez zdekondensowaną chromatynę i uwięzione w niej białka jest ciągnięta przez neutrofila niczym „ogon komety”, stanowiąc - w dosłownym tego słowa znaczeniu – pułapkę na patogeny i funkcjonując jak niezwykle skuteczny aparat bakteriobójczy [Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, et al. *Neutrophil extracellular traps kill bacteria. Science. 2004;303:1532–5. doi: 10.1126/science.1092385*]. Szczególnie interesującym mnie aspektem jest kwestia autoregulacji w obrębie NETs oraz znalezienie odpowiedzi na pytanie czy wpływ NETs na hemostazę jest stały czy może ulega on zmianom w czasie w miarę powstawania reaktywnych produktów (np.

HOCl) w obrębie NETs, co mogłoby zmieniać właściwości obecnych w tych strukturach modulatorów hemostazy.

Planuję dalszy rozwój współpracy badawczej zarówno w obrębie macierzystej jednostki, jak i z udziałem kooperantów krajowych i zagranicznych oraz podjęcie nowych współprac. Tematyka badawcza będzie obejmowała zarówno szeroko pojętą regulację (na poziomie komórkowym i molekularnym) odpowiedzi prokoagulacyjnej płytek krwi, izolację i charakterystykę naturalnych związków o potencjale modulatorów hemostazy i określenie ich wpływu na kinetykę krzepnięcia, strukturę skrzepu i fibrylizację, czy dalsze badania nad biokompatybilnością i cytotoksycznością materiałów o potencjalnym zastosowaniu medycznym.

Dalsze badania we współpracy z Instytutem Biochemii Ukraińskiej Akademii Nauk w Kijowie dostarczą danych pozwalających na dokładniejszą identyfikację roli płytek krwi w inicjacji i regulacji procesu fibrylizacji. Ponadto, we współpracy z Kliniką Alergologii i Chorób Wewnętrznych UMB prowadzę projekt mający na celu dokładną identyfikację źródła zahamowanej fibrylizacji u pacjentów z astmą. Współpraca podjęta przez Zakład Chemii Fizycznej UMB z Kliniką Onkologii UMB będzie skutkowałą z kolei systematycznym badaniem oceniającym zmiany hemostazy u pacjentów leczonych onkologicznie, ze szczególnym uwzględnieniem zmienionej reaktywności płytek krwi, retrakcji skrzepu i fibrylizacji.

Po uzyskaniu stopnia doktora pełniłem/pełnię rolę kierownika 7 projektów oraz rolę wykonawcy 23 projektów finansowanych przez Uniwersytet Medyczny w Białymstoku oraz rolę kierownika 1 projektu i wykonawcy w 1 projekcie finansowanym ze źródeł zewnętrznych. Wykaz projektów znajduje się w *Załączniku nr 4* natomiast dokumenty potwierdzające pozyskanie funduszy ze środków zewnętrznych i pełnienie roli wykonawcy/kierownika znajdują się w *Załączniku nr 7* dokumentacji.

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

6a) Osiągnięcia dydaktyczne

Przygotowanie i prowadzenie zajęć dydaktycznych na Wydziale Farmaceutycznym

z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku:

1. Przygotowanie i prowadzenie ćwiczeń z przedmiotu *Biofizyka* dla studentów I roku Farmacji (od 2020 r.).
2. Przygotowanie i prowadzenie ćwiczeń z przedmiotu *Biofizyka w kosmetologii* dla studentów I roku Kosmetologii (od 2016 r.)
3. Przygotowanie i prowadzenie ćwiczeń z przedmiotu *Chemia fizyczna* dla studentów I roku Analityki medycznej (od 2009 r.).
4. Przygotowanie i prowadzenie ćwiczeń z przedmiotu *Chemia fizyczna* dla studentów II roku Farmacji (od 2009 r.).
5. Przygotowanie i prowadzenie wykładów z przedmiotu fakultatywnego *Mechanizmy przekazywania sygnału w komórkach (na przykładzie płytek krwi)* dla studentów I roku Analityki medycznej (od 2018 r.).
6. Przygotowanie i prowadzenie wykładów z przedmiotu fakultatywnego *Mechanizmy przekazywania sygnału w komórkach* dla studentów II roku Farmacji (od 2017 r.).
7. Przygotowanie i prowadzenie wykładów z przedmiotu fakultatywnego *Postępy w technikach badawczych oceniających właściwości powstającego skrzepu* dla studentów IV roku Analityki medycznej (od 2019 r.)

Opieka naukowa nad studentami:

1. Od roku 2010 pełniłem funkcję **opiekuna** 11 prac magisterskich realizowanych na Wydziale Farmaceutycznym z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku (6 na kierunku Analityka medyczna i 5 na kierunku Farmacja).
2. Od roku 2016 pełniłem funkcję **promotora** 13 prac magisterskich realizowanych na Wydziale Farmaceutycznym z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku (wszystkie na kierunku Farmacja).
3. Od roku 2016 pełniłem funkcję **recenzenta** 5 prac magisterskich realizowanych na Wydziale Farmaceutycznym z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku (4 na kierunku Farmacja i 1 na kierunku Kosmetologia).

4. Od 2017 r. jestem członkiem zespołu hospitującego ćwiczenia na kierunku Farmacja.
5. W czerwcu 2018 roku pełniłem opiekę naukową w trakcie pobytu stypendystki FEBS (*The Federation of European Biochemical Societies*) Olgi Revki (doktorantki w Instytucie Biochemii Ukraińskiej Akademii Nauk z Kijowie) w Zakładzie Chemii Fizycznej Wydziale Farmaceutycznym z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku, związanej z realizacją grantu dla młodych naukowców.

Opieka naukowa nad doktorantami w charakterze promotora pomocniczego:

1. Agata Gołaszewska „Ocena wpływu adrenaliny na aktywność płytek krwi zdrowych ochotników” (realizowana w latach 2017-2021, promotor pomocniczy od 2019 roku; doktorat zakończony z powodzeniem obroną rozprawy doktorskiej w 2021)

6b) Osiągnięcia organizacyjne

1. Członek Wydziałowego Zespołu do Spraw Zapewnienia i Doskonalenia Jakości Kształcenia na kierunku Farmacja, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku (od 2016 r.)
2. Opiekun I roku kierunku Analityka Medyczna (od 2017 r.)

6c) Osiągnięcia w zakresie popularyzacji nauki

1. Brałem czynny udział w 22. Pikniku Naukowym na Stadionie Narodowym w Warszawie na stanowisku Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku (2018).
2. Odpowiadałem za organizację i prowadzenie pokazów dla uczniów szkół średnich „Elektryczność i magnetyzm w otaczającym nas świecie – zadziwiające właściwości cieczy, owoców i metali” (dwukrotnie w 2019).
3. Brałem czynny udział w Dniach Otwartych Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku (2022) – prezentacja tematyki badawczej Zakładu uczniom białostockich szkół średnich.

7. Nagrody i stypendia naukowe

Nagrody za prezentacje prac naukowych na konferencjach:

1. W 2017 roku zdobyłem pierwszą nagrodę za najlepszą prezentację ustną podczas XXVII Międzynarodowego Kongresu Polskiego Towarzystwa Fizjologicznego (odbywającego się w Białymstoku) w panelu „Blood and hemostasis”.
2. W 2019 roku zdobyłem pierwszą nagrodę za najlepsze wystąpienie ustne podczas XV International Scientific Conference for Students and PhD Students "Youth and Progress of Biology" (odbywającej się we Lwowie), w kategorii „Human and animals physiology, biomedicine”.

Nagrody za publikacje naukowe:

1. W latach 2015 i 2018, 2020 otrzymałem nagrodę I stopnia Rektora Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku za działalność naukową.
2. W latach 2013, 2016 i 2022 otrzymałem nagrodę II stopnia Rektora Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku za działalność naukową.
3. W latach 2017 i 2021 otrzymałem nagrodę III stopnia Rektora Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku za działalność naukową.
4. W 2018 roku otrzymałem nagrodę Rektora Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku III stopnia za pozyskanie funduszy na badania ze źródeł zewnętrznych.

Stypendia naukowe:

1. W roku 2013 zostałem stypendystą „Studiuje, badam, komercjalizuję” (na okres 12 miesięcy, grant UE nr UDAPOKL.08.02.01-20-069/11-00)

Nagrody przyznawane przez studentów:

1. W 2019 roku zostałem wyróżniony tytułem „Najlepszy Nauczyciel Akademicki” (II stopnia) w konkursie studentów Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku

8. Udział w kursach, szkoleniach i warsztatach:

1. Szkolenie organizowane przez Beckton Dickinson Polska z cytometrii przepływowej (2016)

2. Szkolenie e-learningowe „Zasady Ochrony Danych Osobowych w Uniwersytecie Medycznym w Białymstoku zgodnie z RODO” (2020)
3. Szkolenie e-learningowe „Korupcja w administracji publicznej” (2020)

Tomasz Misztal