



**ZAKŁAD TRANSFUZJOLOGII KLINICZNEJ**  
CENTRALNEGO SZPITALA KLINICZNEGO  
MINISTERSTWA OBRONY NARODOWEJ  
**WOJSKOWY INSTYTUT MEDYCZNY**  
ul. Szaserów 128, 04-141 Warszawa 44, tel. 261817206, fax 261817247  
e-mail: [zt@wim.mil.pl](mailto:zt@wim.mil.pl)

Kierownik Zakładu : **prof.nadzw.dr hab.n.med. JOLANTA KORSAK**



ISO 9001:2015  
AQAP 2110:2016

Warszawa, dnia 09.08.2021r.

### Ocena

**rozprawy na stopień doktora nauk medycznych mgr Mateusz Dziemiańczuka pt.:**  
**„Wzrost uwalniania mikrocząstek u pacjentów z wybranymi chorobami rozrostowymi**  
**krwi oraz ich korelacja z markerami układu hemostazy”**

Mikrocząstki są pęcherzykami błonowymi uwalnianymi do krążenia przez komórki krwi, komórki endotelialne, a nawet przez komórki nowotworowe. Są heterogenne, mogą odgrywać rolę w procesach związanych z apoptozą komórek i reakcją na stres oksydacyjny. Są powszechnie obecne we krwi zdrowych osobników a zwiększenie ich stężenia obserwowane jest w osoczu chorych na chorobę zakrzepową, cukrzycę, choroby sercowo-naczyniowe oraz w niektórych chorobach rozrostowych. W opublikowanych badaniach zwrócono uwagę, że zwiększenie ich stężenia w przypadku różnych chorób może zwiększyć aktywność prokoagulacyjną mikrocząstek, co może mieć wpływ na całą hemostazę, powikłania choroby, a w tym na rokowanie.

Wysoce interesującym i aktualnym jest zatem poszukiwanie przez mgr Mateusza Dziemiańczuka korelacji mikrocząstek uwalnianych w przebiegu chorób rozrostowych krwi z markerami układu hemostazy.

Przedłożona mi do oceny rozprawa zawiera 55 stron wydruku komputerowego, w tym: 8 tabel, 10 rycin i 130 pozycji piśmiennictwa. Praca zredagowana jest w układzie klasycznym i składa się z 8 rozdziałów i szeregu podrozdziałów.

Treść rozprawy poprzedzono wykazem skrótów, których zastosowanie poprawia zwięzłość pracy.

Wstępna część rozprawy to obszerny, zajmujący 18 stron, przegląd danych z piśmiennictwa, w których doktorant przedstawił mechanizm wytwarzania mikrocząstek. Opisano asymetryczny rozkład cząstek różnych fosfolipidów, enzymów białkowych i białek strukturalnych w błonie komórek. Zdaniem recenzenta umieszczenie przez autora graficznych

modeli tworzenia się mikrocząstek znacznie ułatwiłoby zrozumienie tego mechanizmu i uczyniłoby tę część pracy ciekawszą. Doktorant, w tej części opisu zwrócił uwagę na klasyfikację mikrocząstek. Kryteriami klasyfikacji były: rozmiar i geneza powstawania cząstek. W ten sposób wyróżniono egzosomy, mikropecherzyki błonowe i ciała apeptyczne. Szczegółowo omówił aktualny stan wiedzy i bieżące piśmiennictwo na temat udziału mikrocząstek w patogenezie chorób. Obecność mikrocząstek pochodzących z różnych komórek wiązana jest przez niektórych autorów z zaburzeniami odporności humoralnej polegających na jej aktywności, w tym opsonizacji przeciwciałami i aktywacji dopełniacza u chorych. Przypisuje im się również udział w zaburzeniach odporności komórkowej wiążących się z immunosupresją. Wzrost liczby mikrocząstek w niektórych chorobach może prowadzić także do zaburzeń krzepnięcia. Wykazują one zarówno aktywność prokoagulacyjną, głównie mikrocząstki pochodzenia płytkowego, które posiadają dużą liczbę miejsc wiążących dla osoczowych czynników krzepnięcia (IXa, VIII, Va i IIa), a także aktywność antykoagulacyjną, ponieważ z wyeksponowaną na swej powierzchni fosfatydyloseryną biorą udział w tworzeniu trombiny. Trombina, z kolei aktywuje białko C uczestniczące w degradacji czynników krzepnięcia Va i VIIIa.

Doktorant podjął się zadania badawczego, którego celem było określenie liczby mikrocząstek pochodzących z komórek krwi i śródbłonna oraz ich korelacji z wybranymi parametrami układu hemostazy u chorych z chorobami rozrostowymi przez rozpoczęciem leczenia. Zdaniem recenzenta uwaga doprecyzowująca czas wykonywanych badań powinna być umieszczona w metodyce badań.

Realizując cel badawczy doktorant zakwalifikował do badania 56 chorych z różnymi chorobami wzrostowymi krwi. Jedynym kryterium selekcji do badań był czas włączenia odpowiedniego leczenia (tzn. przed włączeniem leczenia). Chorych podzielono na 5 grup badanych w zależności od rodzaju rozpoznania. Przedstawiona przez doktoranta charakterystyka jest bardzo skąpa. Myślę, że stwierdzenia, że chorobę rozpoznano na podstawie badania cytometrycznego czy cytogenetycznego to zbyt mało aby charakteryzować grupy. Należałoby jednak podać cechy charakterystyczne rozpoznania. Ponadto, informacje zawarte w tabeli 10 nie są porównaniem grup, tylko ich charakterystyką, grupy te są bowiem niejednorodne. W charakterystyce chorych brakuje również informacji dotyczącej, czy dla chorych zakwalifikowanych do grup badanych było pierwsze rozpoznanie, czy po kolejnej remisji i poprzednich leczeniach i czy mogło to mieć wpływ na otrzymane wyniki badań. Grupę kontrolną stanowił materiał pobrany od zdrowych ochotników/dawców krwi. Niedosyt budzi brak informacji czy ochotnicy/dawcy wyrazili zgodę na pobranie próbek krwi do badań.

Na podkreślenie zasługuje zastosowanie wysoce swoistej dwubarwnej metody cytometrii przepływowej pozwalające na wybiórcze odróżnienie mikrocząstek pochodzących z różnych komórek, w oparciu o cytometr dedykowany do oznaczeń nano- i mikroobiektów. Cytometryczne zliczanie dużej liczby cząstek charakteryzuje się nadzwyczaj wysoką dokładnością i precyzją pod warunkiem zastosowania odpowiednich kontroli (np. ślepej czy izotopowej) zapewniło to wysoką wiarygodność otrzymanych wyników i przeprowadzonych porównań. Liczba mikrocząstek w badanych próbkach wyliczana była z opisanego w metodyce wzoru. Brakuje w tym opisie dowodów na budowanie zastosowanego wzoru lub cytowania, jeśli wzór ten był wcześniej opublikowany. Podczas omawiania metody i przedstawionym wzorze podobnie jak w pozostałych częściach rozprawy doktorant dość dowolnie zamiennie stosuje pojęcie „ilość” i „liczbę” czasem „poziom” w odniesieniu do mikrocząstek. Za „Lekarskim Poradnikiem Językowym” (Polski Tygodnik Lekarski, 1981; 22) pozwolę sobie przytoczyć definicje „ilości” i „liczby”:

- liczba - jest pojęciem, którego treścią jest wynik liczenia wyrażony zwykle cyframi. Liczba odnosi się więc do rzeczy „policzalnych”, a takimi są mikrocząstki, które można kolejno policzyć
- ilość – jest miarą tego, co może być mierzone lub wazone tj. odnosi się do rzeczy „niepoliczalnych”, np. parametrów układu krzepnięcia, stężenia jonów, pojęć abstrakcyjnych

Zatem w przypadku mikrocząstek bardziej precyzyjnym określeniem jest liczba mikrocząstek.

W następnym etapie pracy badawczej doktorant skorelował liczbę mikrocząstek pochodzących z różnych komórek z wybranymi parametrami układu krzepnięcia krwi w zależności od rodzaju choroby. W analizie statystycznej autor zastosował proste choć uznane metody statystyczne. Pozwoliły one jednak na wiarygodną ocenę uzyskanych wyników. Otrzymane wyniki przedstawiono w postaci zestawień tabelarycznych oraz wykresów, opisanych na 13 stronach. W tym zbiorze danych i porównań doktorant przedstawił informacje, które potrafił logicznie uporządkować i poddać analizie. Dobrze się stało, że ta część dysertacji została podzielona na podrozdziały. W kolejnych podrozdziałach przedstawiono porównanie parametrów morfologicznych i układu krzepnięcia krwi oraz liczby mikrocząstek. Wyniki wskazywały, że w porównaniu z grupą kontrolną liczba leukocytów była statystycznie wyższa u chorych z rozpoznaniem czerwienicy prawdziwej, nadpłytkowości samoistnej i przewlekłej białaczki limfocytowej. Natomiast liczba krwinek czerwonych była istotnie statystycznie wyższa u chorych z czerwienicą prawdziwą, ostrą

białaczką szpikową, przewlekłą białaczką limfocytową i szpiczaku mnogim, a płytki krwi u chorych z nadpłytkowością samoistną i ostrą białaczką szpikową. Analizując parametry układu hemostazy autor wykazał istotne statystycznie wydłużenie czasu protrombinowego w przebiegu nadpłytkowości samoistnej i ostrej białaczki szpikowej. Czas częściowej tromboplastyny po aktywacji był znamienne statystycznie wydłużony w przebiegu czerwienicy prawdziwej i ostrej białaczki szpikowej, a stężenie fibrynogenu u chorych z czerwienicą prawdziwą oraz przewlekłą białaczką limfocytową.

Z obowiązku recenzenta chciałabym zwrócić uwagę na pewne błędy redakcyjne, które dotyczą tytułów tabel i rycin części wyników:

- tytuły tabel umieszczamy zawsze pod tabelą
- tytuły rycin umieszczamy nad ryciną
- dla lepszej czytelności rycin i tabel pod każdą z nich należałoby umieścić rozwinięcie stosowanych skrótów tak jak doktorant zrobił to w przypadku ryciny 1
- w przypadku rycin 1-7 w tytułach powinno być umieszczone słowo „porównanie”, ponieważ uzyskane wyniki autor porównywał z grupą kontrolną.

Porównując pozostałe parametry układu krzepnięcia krwi doktorant wykazał, że stężenia kompleksów trombina-antytrombina, kompleksów plazmina-antypłazmina oraz stężenie fragmentów protrombiny 1+2 były wyższe w różnych grupach badanych.

Kolejna część wyników to porównanie liczby mikrocząstek pochodzących z różnych komórek krwi w grupach badanych. Autor wykazał, że w każdej grupie chorych nastąpił statystycznie istotny wzrost liczby mikrocząstek. Na uwagę zasługuje fakt, że wzrost, rodzaj liczby mikrocząstek odpowiadał liczbie dominujących komórek krwi w danej chorobie. Na rycinie 8 oprócz wykresów dotyczących liczby mikrocząstek znajduje się tabela przedstawiająca całkowitą liczbę komórek krwi. Recenzent nie rozumie jakich komórek krwi dotyczy i jakiemu porównaniu służy. Rycina 10 przedstawia „porównanie” a nie „zestawienie” liczby mikrocząstek pochodzących z różnych typów komórek krwi w grupach badanych z grupą kontrolną.

Następne części rozdziału to ocena korelacji rodzajów mikrocząstek z parametrami układu krzepnięcia krwi w badanych grupach chorych. Doktorant wykazał, że w przebiegu czerwienicy prawdziwej wzrost całkowitej liczby mikrocząstek koreluje dodatnio z wydłużeniem APTT i obniżeniem stężenia fibrynogenu. Natomiast w przebiegu nadpłytkowości samoistnej wzrost liczby mikrocząstek korelował ze skróceniem APTT i wzrostem stężenia D-dimerów, w przebiegu przewlekłej białaczki limfocytowej, obserwowano silną pozytywną korelację liczby mikrocząstek i wydłużenia czasu

protrombinowego. W przebiegu ostrej białaczki limfocytowej doktorant wykazał wydłużenie czasów PT i APTT a także wyższe stężenie D-dimerów i obniżone stężenie kompleksów F1+2 w porównaniu do grupy kontrolnej.

Niezwykle ważnym osiągnięciem doktoranta jest wykazanie, że w chorobach rozrostowych współistnieją zaburzenia układu krzepnięcia krwi i silnie korelują z liczbą wytwarzanych mikrocząstek pochodzących z różnych komórek krwi. Uzyskane wyniki mogą sugerować, że mikrocząstki mogą nie tylko mieć wartość diagnostyczną, ale mogą stanowić nowy czynnik ryzyka występowania powikłań zakrzepowych u chorych na choroby rozrostowe krwi.

Wyniki zostały omówione i przedyskutowane na 6 stronach i porównane z wieloma danymi z piśmiennictwa. Omówienie jest bardzo ostrożne ograniczające się do dokładnego przedstawienia stwierdzonych, istotnych statystycznie różnic lub ich braku pomiędzy grupami badanymi, a grupą kontrolną. Świadczy to o należyтым sceptycyzmie doktoranta oraz o umiejętnym zapobieganiu wyciągnięciu pochopnych wniosków. Dużą zaletą i osiągnięciem rozprawy jest jej niezaprzeczalny walor praktyczny. Doktorant wykazał, że badania mikrocząstek mogą pomóc w zrozumieniu patofizjologicznych mechanizmów różnych chorób, a ich prozakrzepowa aktywność w różnych chorobach rozrostowych krwi może się przyczynić do rozwoju powikłań. Zatem, badania mikrocząstek mogą mieć dużą wartość diagnostyczną.

Na podstawie przeprowadzonych badań i otrzymanych wyników doktorant przedstawił ostrożne wnioski, w pełni adekwatne do możliwości i ograniczeń metodologii naukowej. Wniosek czwarty mógłby być bardziej ogólny, wówczas mógłby stać się wskazówką do dalszych poszukiwań.

Słabą stroną opracowania jest jego redakcja, o części błędów redakcyjnych wspomniałam w treści recenzji, pozostałe to literówki, których nie będę wymieniać, inne to np.:

- str. 6 dół, jest „czy” powinno być „gdy”
- str. 25 góra jest „badawczych” powinno być „badanych”
- rozdz. 4.4.6. – wyrwany z kontekstu
- str. 40 jest „dla podwyższenia” powinno być „podwyższone”
- str. 42 góra jest „obserwowany” powinno być „obserwowano”

Bardzo często autor stosuje w tekście żargon medyczny, co jest poniekąd wytłumaczalne, ponieważ doktorant nie jest lekarzem, ale dla czytelnika tekst sprawia wrażenie pozbawionego kultury pisania rozprawy doktorskiej.

Powyższe uwagi dotyczące formy redakcyjnej dysertacji, a także nieścisłości stylistyczne i literowe nie umniejszają wartości naukowej pracy, a ich uwzględnienie mogłoby posłużyć poprawie naukowej konkretności i lepszej informatywności.

Reasumując, stwierdzam, że przedłożona mi do oceny rozprawa doktorska jest opracowaniem o znaczeniu praktycznym i stymulującym do dalszych badań. Odpowiada ona na wytyczony cel pracy. Mgr Mateusz Dziemiańczuk wykazał umiejętność zaplanowania badań, przedstawienia wyników i właściwej ich interpretacji w oparciu o znajomość piśmiennictwa.

Wyrażam przekonanie, że oceniana praca spełnia wszelkie wymogi stawiane rozprawom na stopień doktora nauk medycznych. Wnoszę przeto wniosek do Wysokiego Senatu Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku o dopuszczenie mgr Mateusza Dziemiańczuka do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

