Katedra i Klinika Hematologii, Nowotworów Krwi
i Transplantacji Szpiku
Wybrzeże L. Pasteura 4, 50-367 Wrocław
Tel.: 71-784 25 76

Wrocław, 30.05.2021

Recenzja rozprawy doktorskiej lek. Agaty Bryk
„Novel factors modyfying properties of fibrin and efficacy of fibrinolysis in patients with type 2 diabetes mellitus"
„Nowe czynniki modyfikujące właściwości fibryny i sprawność fibrynolizy u pacjentów z cukrzycą typu 2"

Niniejszą recenzję rozprawy doktorskiej lek. Agaty Bryk, zatytułowaną jak wyżej, sporządziłam wykonując uchwałę Rady Dyscypliny Nauki Medyczne Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie podjętą na posiedzeniu w dniu 9 marca 2021 r.

Zarówno budowa jak i funkcjonowanie układu fibrynolizy nie są w pełni poznane nawet u osób zdrowych, co sprawia, że niełatwo jest ocenić zmiany zachodzące pod wpływem różnych, czasem złożonych stanów chorobowych, i ich leczenia. Dodatkowo do trudności w ocenie fibrynolizy przyczynia się też niezwykle krótki czas połowicznego rozpadu ($t_{1/2}$) czynników i inhibitorów uczestniczących w tym procesie, bowiem o ile dla niektórych mierzony jest w dniach, np. fibrynogen (3-5 d), plazminogen (2,2 d) czy α2-antyplazmina (2,6 d), to dla innych trwa chwilę i wynosi znikome ułamki dni, odpowiednio dla: tkankowego aktywatora plazminogenu (t-PA) = 0,00167 d, aktywowanego przez trombinę aktywatora fibrynolizy (TAFI) = 0, 00694 d, i inhibitora aktywatora plazminogenu 1 (PAI-1) = < 0,00694 d. (*na podstawie: Ziedins KB, Mann KG: Overview of hemostasis Chpt 1 Textbook of Hemophilia. (3rd ed) Christine A Lee, Berntrop EE and Hoots K. 2014 John Wiley & Sons, Ltd; 3-8*).

Doktorantka postanowiła ocenić wybrane wewnętrzne i zewnętrzne regulacje fibrynolizy w cukrzycy typu 2 (ang. *type 2 diabetes mellitus*, T2DM). Jest to zadanie niełatwe i możliwe do wykonania tylko w wysoko specjalistycznym ośrodku naukowym.

Lek. Agata Bryk sformułowała cztery istotne hipotezy badawcze dotyczące potencjalnego udziału nowych czynników w kształtowaniu prozakrzepowego fenotypu skrzepu fibrynowego i sprawności fibrynolizy u chorych na cukrzycę typu 2, obciążonych i nieobciążonych powikłaniami sercowo-naczyniowymi.

Są to:

1. wzrost nasilenia stresu oksydacyjnego stwierdzone w osoczu wiąże się z hipofibrynolizą i zwiększa ryzyko incydentów sercowo- naczyniowych,
2. zwiększenie intensyfikacji tworzenia zewnątrzkomórkowych pułapek neutrofilowych (*neutrophil extracellular traps*, NETs) osłabia fibrynolizę, zwłaszcza u chorych na T2DM z powikłaniami sercowo-naczyniowymi
3. jakie są potencjalne zależności między glikacją α2-antyplazminy i jej zwiększonym wbudowywaniem do skrzepu fibrynowego a poziomem glikemii i stopniem kontroli T2DM
4. czy i w jakiej mierze sprawność fibrynolityczna kwasu askorbinowego (ASA) zależy od konkurencji między miejscami glikacji i acetylacji α2-antyplazminy oraz siły jej wiązania z fibryną w skrzepie u chorych na T2DM.

Na osiągnięcie naukowe składa się cykl 5 opublikowanych prac oryginalnych dotyczących różnych aspektów fibrynolizy w cukrzycy typu 2, we wszystkich pierwszym autorem jest lek. Agata Bryl.

Spośród 5 prac 2 zostały opublikowane w 2019 r., 2 w 2020 r. i 1 w 2021 r w anglojęzycznych czasopismach z współczynnikiem wpływu (*impact factor*, IF). Łączna wartość punktowa cyklu wynosi: IF=20,434 (według Thomson Reuters Journal Citation Reports) i 580 punktów (według wykazu czasopism naukowych Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 18 grudnia 2019 r).

1. Bryk AH, Konieczynska M, Rostoff P, Broniatowska E, Hohendorff J, Malecki MT, Undas A: Plasma cel protein oxidation as a determinant of impaired fibrinolysis in type 2 diabetes . Thromb Haemost 2019; 119: 213-222
2. Bryk AH, Prior SM, Plens K, Konieczynska M, Hohendorff J, Butenas S, Malecki MT, Undas A: Predictors of neutrophil extracellular traps markers in

type 2 diabetes mellitus: associations with prothrombotic state and hypofibrinolysis. Cardiovasc Diabetol. 2019; 18: 49. Doi: 10.1186/s12933-019-0850-0

3. Bryk AH, Siudut J, Broniatowska E, Bagoly Z, Barath B, Katona E, Undas A: Sex – specific alteration to α2-antiplasmin incorporation in patients with type 2 diabetes. Thromb Res. 2020; 185: 55-62
4. Bryk AH, Zettl K, Wiśniewski JR, Undas A: Glycation and acetylation sites on fibrynogen in plasma fibrin clot of patients with type 2 diabetes: effects of low-dose acetylosalicylic acid. Thromb Res. 2021; 198: 93-98
5. Bryk AH, Cysewski D, Dadlez M, Undas A: Identification of glycated and acetylated lysine resudues in human α2-antiplasmin. Biochem Biophys Res Commun 2020; 521: 19-23

Badania były prowadzone z przestrzeganiem odpowiednich standardów, tj. w trosce o porównywalność wyników włączanie chorych do badań odbywało się zgodnie z przyjętymi kryteriami diagnostycznymi i stosowano nowoczesne, sprawdzone metody laboratoryjne. Na przykład sprawność lizy skrzepu fibrynowego była oceniana trzema metodami z wykorzystaniem mikropłytek, w modyfikacji własnej na podstawie trzech protokołów.

Metody statystyczne są adekwatne do wymogów opracowania wyników. Pragnę szczególnie pochwalić wykorzystanie analizy wariancji dla wielu próbek z wskaźnikiem fałszywych wykryć przy analizie miejsc modyfikacji α2-antyplazminy.

Na podstawie przeprowadzonych badań lek. Agata Bryk odpowiedziała na postawione ważne hipotezy dotyczące skrzepu fibrynowego u chorych na cukrzycę typu 2.

Doktoranta wykazała co następuje:

1. Potwierdziła, że zmieniający się pod wpływem stresu oksydacyjnego stopień karbonylacji fibrynogenu moduluje właściwości fibryny, przez co zmniejsza się liza skrzepu fibrynowego, co u pacjentów z T2DM ma związek z długotrwałością choroby i współistnieniem powikłań sercowo-naczyniowych (*Thromb Haemost 2019; 119: 213-222*)
2. Ustaliła u pacjentów z T2DM, że zwiększenie stężenia uwolnionych z pułapek neutrofilowych (ang. *neutrophil extracellular traps*, NETs) krążących markerów

H3Cit i cfDNA jest powiązane ze stopniem kontroli glikemii (stężenie glukozy na czczo i wartość HbA 1c), markerami stanu zapalnego o niskim nasileniu i przebyciem zawału mięśnia serca. NEToza może zwiększać ryzyko zakrzepicy i powikłań sercowo-naczyniowych w cukrzycy typu 2 (*Cardiovasc Diabetol. 2019; 18: 49. Doi: 10.1186/s12933-019-0850-0*)

3. Wskazała, że za zwiększone wbudowywanie się α2-antyplazminy do fibryny może częściowo odpowiadać za znaczniejsze upośledzenie fibrynolizy u kobiet w porównaniu ze stwierdzanym u mężczyzn wśród chorych na T2DM (*Thromb Res. 2020; 185: 55-62*)
4. Oceniła oddziaływanie kwasu askorbinowego (ASA) na skrzep fibrynowy u chorych na T2DM:
   - określiła miejsca glikacji i acetylacji na cząsteczce fibrynogenu w osoczowym skrzepie fibrynowym u chorych z T2DM i wskazała nieznane dotąd miejsca glikacji na łańcuchu α fibrynogenu. Wykazała, że w małej dawce ASA nie zwiększał stopnia acetylacji fibrynogenu u chorych z T2DM, natomiast u chorych, którzy nie otrzymywali ASA być może to glikacja blokuje reszty lizyny uprzednio zidentyfikowane jako acetylowane w badaniach *in vitro* (*Thromb Res. 2021; 198: 93-98*)
   - zaproponowała, że u chorych na T2DM zaburzenie czynności α2-antyplazminy i jej zwiększone wbudowywanie do fibryny może zależeć od konkurencji między miejscami glikacji i acetylacji na resztach lizynowych α2-antyplazminy, co obserwowano w badaniach przy wysokim stężeniu cukru i w obecności ASA (*Biochem Biophys Res Commun 2020; 521: 19-23*)

Doktorantka posiada solidną wiedzą w zakresie hemostazy i cukrzycy typu 2. Udowodniła swą dojrzałość merytoryczną, umiejętność korzystania z piśmiennictwa naukowego, planowania i realizacji badań w dziedzinie nauk medycznych oraz poprawnej interpretacji ich wyników.

Jakość prac tworzących cykl została już wcześniej pozytywnie zweryfikowana przez recenzentów przed publikacją i ja również w pełni zgadzam się z tą oceną.

Podsumowując stwierdzam, że przedłożona mi do oceny rozprawa doktorska lek. Agaty Bryk „Novel factors modyfying properties of fibrin and efficacy of fibrinolysis in patients with type 2 diabetes mellitus" (Nowe czynniki modyfikujące właściwości

fibryny i sprawność fibrynolizy u pacjentów z cukrzycą typu 2) stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, wykazuje teoretyczną wiedzę Doktorantki w zakresie odpowiedniej dyscypliny naukowej oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Tym samym spełnia ona wszystkie ustawowe wymogi stawiane rozprawom doktorskim.

Mam więc zaszczyt wnosić prośbę do Rady Dyscypliny Nauki Medyczne Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie o dopuszczenie lek. Agaty Bryk do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Wysoko oceniam wartość merytoryczną tej wybitnej rozprawy doktorskiej i dlatego wnioskuję aby nagrodzić Jej Autorkę lek. Agatę Bryk.

Prof. dr hab. n.med. Maria Podolak-Dawidziak
Recenzent
Maria Podolak-Dawidziak