



Wydział Farmaceutyczny
z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej
Gdański Uniwersytet Medyczny
Al. Gen. J. Hallera 107
80-416 Gdańsk

dr hab. Rafał Bartoszewski
prof. GUMed
email: rafalbar@gumed.edu.pl
Tel.: 721 703 179

Gdańsk, 21.02.2018

**Ocena pracy doktorskiej
mgr Anny Siekierzyckiej
pt. „Mechanizm dysfunkcji śródbłónka w patogenezie miażdżycy
naczyń”**

Miażdżycza jest uważana za powszechne schorzenie społeczeństw rozwiniętych, bezpośrednio związane ze współczesną długością i stylem życia. Pomimo że, w 1852 roku Johann Nepomuk Czermak zidentyfikował zmiany miażdżycowe w aorcie mumi egipcjanki, to dopiero odkrycia ostatnich lat opublikowane jako badania HORUS (Thompson i wsp. w Lancet 381, No. 9873, p1211–1222, 2013 oraz Thompson i wsp. w JACC: Cardiovascular Imaging 4, Issue 4, 2011), jasno wykazały, że miażdżycza towarzyszy ludzkości od przynajmniej 4000 lat. Tym samym powszechna obecność zmian miażdżycowych w społeczeństwach preindustrialnych, nie narażonych na znane współczesne czynniki ryzyka wstąpienia tego schorzenia, wskazuje na istnienie podstawowych molekularnych mechanizmów leżących u podstaw rozwoju miażdżycy. Mając na względzie powszechność występowania schorzeń kardiowaskularnych i ograniczona skuteczność dedykowanych im terapii, bezdyskusyjna jest więc konieczność zdefiniowania tych podstawowych mechanizmów determinujących patogenezę miażdżycy naczyń.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska mgr Anny Siekierzyckiej wykonana pod kierunkiem dr hab. Leszka Kalinowskiego profesora Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, stanowi cenny wkład do wiedzy dotyczącej powyższej tematyki.

Celem pracy doktorskiej było bowiem określenie mechanizmów molekularnych determinujących, obserwowany podczas miażdżycy, spadek biodostępności kluczowej dla homeostazy śródbłonna cząsteczki sygnałowej - tlenku azotu (NO). Co warte podkreślenia, modelem badawczym były fragmenty ludzkich naczyń tętnicznych, zarówno ze zmianami miażdżycowymi jak i niezmiażdżycowymi.

Do recenzji dostarczono rozprawę doktorską liczącą 95 stron łącznie z wykazem piśmiennictwa. Przedstawiona praca zawiera wszystkie wymagane części i składa się z 9 głównych rozdziałów: wstępu, celu, materiałów i metod, wyników, omówienia i dyskusji wyników, wniosków, streszczeń, oraz spisu piśmiennictwa.

Wstęp rozprawy obejmuje 16 stron a przytaczane i omówione tym rozdziale dane całkowicie uzasadniają aktualność podjętego tematu i celów pracy doktorskiej. Doktorantka rozpoczyna ten rozdział od omówienia znaczenia śródbłonna oraz mechanizmów syntezy i działania tlenku azotu, w kontekście homeostazy tej tkanki. Konsekwentnie w dalszych podrozdziałach, doktorantka definiuje zaburzenie tego dobrostanu jako dysfunkcję leżącą u podstaw powstawania zmian miażdżycowych. Kolejny podrozdział zatytułowany "Patofizjologia miażdżycy" wprowadza szczegółowe informacje dotyczące klasyfikacji zmian miażdżycowych, towarzyszących im zjawisk molekularnych jak i konsekwencji klinicznych tych zmian. W ostatniej części wprowadzenia, posługując się aktualnymi danymi epidemiologicznymi, Doktorantka podkreśla znaczenie społeczne i ekonomiczne, opracowania skutecznych terapii dla schorzeń sercowo - naczyniowych.

Wstęp zaczyna się więc nietypowo, od przedstawienia szczegółowego problemu - roli NO w utrzymaniu homeostazy endotelium, i mechanizmów determinujących syntezę tego transmittera, poprzez konsekwencje fizjologiczne, patologiczne i społeczne związane z ze spadkiem biodostępności tej cząsteczki. Taka konstrukcja logiczna wstępu, podobnie jak dobór przedstawionych informacji, **zasługuje na wyróżnienie**, i stanowi bardzo dobre wprowadzenie do realizowanych badań. W opinii recenzenta doktorantka z powodzeniem sprostała trudnemu wyzwaniu, selekcji z pośród oceanu informacji, tych właściwych dla adresowanego przez jej rozprawę problemu, i przedstawieniu ich we właściwych dla tematyki badawczej proporcjach.

Wstęp nie jest jednak pozbawiony drobnych potknięć redakcyjnych (na stronie 12, linia 19 praca źródłowa nr 14 jest błędnie przytoczona; na stronie 14, linia 6, poprawnym określeniem jest "ilość wytwarzanego NO"; na stronie 20, linia 26 powinno być "ApoE"). Ponadto, na stronie 19 doktorantka przytacza czynniki i związane z nimi mechanizmy, które sprzyjają dysfunkcji śródbłonna, w tym również dym tytoniowy, jednak nie podaje jakie mechanizmy molekularne leżą u podstaw jego niekorzystnego wpływu na tę tkankę.

Przegląd 129 pozycji piśmiennictwa, wskazuje na **dobre przygotowanie Doktorantki i** zrozumienie podjętej tematyki badawczej.

Nie mam również poważnych uwag krytycznych dotyczących sposobu opracowania części dotyczącej **szerokiego spektrum zastosowanych metod badawczych**. Zwracam jedynie uwagę, że nie zdefiniowano jednostek aktywności używanych enzymów np. reduktazy azotanowej (str.45), jak również nie doprecyzowano stężenia procentowego wykorzystanego kwasu trójchlorooctowego (np. wagowo-objętościowe). Inne drobne błędy redakcyjne w tej części to na stronie 36, linia 15 powinno być "przez enzym"; zaś nazwy genów nie zawsze są zapisywane kursywą. Również "Eliminacja jonów dwuwartościowych" byłyby bardziej poprawnym tytułem podrozdziału 3.9.2. **Natomiast na pochwałę zasługuje niezwykle przejrzyste przedstawienie unikalnej metodyki oznaczeń elektrochemicznych w czasie rzeczywistym NO, anionu rodnika ponadtlenkowego, i nadtlenoazotynu.**

Dążąc do osiągnięcia **podstawowego celu pracy Autorka** porównała ilość mRNA genu *NOS3* i translatowanej z niego śródbłonkowej syntazy tlenu azotu (eNOS), w tętnicy objętej procesem miażdżycowym w odniesieniu do tętnicy niezmiędzycowanej, wykazując wyższą ekspresję tego enzymu w tkance zmienionej. Równocześnie, badania Kandydatki wykazały, że enzym ten w tętnicach zmiędzycowanych częściej przybiera konformację niezdolną do produkcji NO, natomiast wytwarzającą anion rodnika ponadtlenkowego. Ten rezultat Doktorantka potwierdziła pomiarami wolnego biologicznie NO produkowanego przez eNOS, i wykazała spadek ilości NO wydzielanego przez śródbłonek tętnicy zmiędzycowanej, czemu towarzyszyło rozprężenie eNOS, czyli wzrost ilości wytwarzanego O_2^- oraz $ONOO^-$. **Należy podkreślić iż, uzyskane przez Kandydatkę rezultaty pozwalają jej na postawienie fundamentalnej dla zrozumienia mechanizmów leżących u podstaw miażdżycy tezy, że w przypadku tego schorzenia celem strategii terapeutycznych nie jest zwiększenie ilości syntazy tlenu azotu, a uzyskanie kontroli nad specyficznością tego enzymu, tak aby przeciwdziałać jego rozprężeniu.**

Autorka w swej pracy osobno omawia parametry kinetyczne dla każdej z aktywności enzymatycznych eNOS, natomiast, podobnie jak dla innych enzymów o dwojakiej aktywności katalitycznej (np. RuBisCo) istnieje możliwość zapisu funkcji katalitycznej enzymu w postaci współczynnika specyficzności (SF). Chciałbym zapytać kandydatkę jak taki współczynnik byłby zdefiniowany i jakie zalety ma taki opis aktywności ?

Kolejnym ważnym osiągnięciem Autorki było wskazanie rozerwanie klastra tiolowo-cynkowego w obrębie dimeru enzymu, co w konsekwencji prowadzi do dysocjacji monomerów

eNOS, jako jednej z głównych przyczyn rozprężenia tego enzymu podczas miażdżycy, i w konsekwencji spadku biodostępności NO.

Sposób prezentacji wyników przez Kandydatkę nie budzi zastrzeżeń, zaś drobne błędy redakcyjne nie wpływają na jakość ocenianej pracy (opisy niektórych osi na wykresach wykonano zarówno w język polskim jak i angielskim: ryciny nr 35, 36, 37 oraz 38). Ułatwieniem dla czytelnika byłoby również konsekwentne zastosowanie jednostek względnych w odniesieniu do tętnicy niezmiażdżycowanej.

Pragnę podkreślić, że prace eksperymentalne, które charakteryzują mechanizmy molekularne od fenotypu klinicznego, poprzez zmiany transkryptyczne, na poziomie białka i finalnie na poziomie aktywności biologicznej, są niezwykle rzadkie, i zasługują na publikację w czołowych czasopismach.

Za tym krótkim podsumowaniem osiągnięć mgr Anny Siekierzyckiej dotyczącym jej pracy doktorskiej, stoją warte podkreślenia liczby wykonanych różnorodnych i często unikalnych eksperymentów - ten bogaty warsztat młodego badacza aplikowano dla dwóch 15 - osobowych kohort.

Na każdym etapie pracy **należy podkreślić bardzo dojrzałą dyskusję**, jaką Autorka prowadziła w omawianiu wyników eksperymentów, wskazując na istotne czynniki wpływające na końcowe efekty prowadzonych badań. Doktoranta krytycznie bowiem podchodziła do uzyskanych wyników, nie nadinterpretowała znaczenia poszczególnych obserwacji, rzeczowo i konsekwentnie przedstawiała przyjętą linię rozumowania.

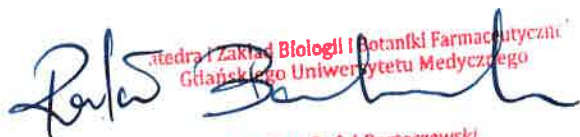
Rozprawa mgr Anny Siekierzyckiej spełnia więc wymagania stawiane pracom na stopień naukowy doktora i znakomicie dokumentuje opanowany przez Doktorantkę warsztat naukowy.

Wnioski końcowe

Recenzowaną pracę oceniam bardzo wysoko z uwagi na unikalny warsztat badawczy, duże walory naukowe i społeczne uzyskanych wyników.

W świetle wyżej przedstawionej, pozytywnej oceny recenzowanej rozprawy doktorskiej, stwierdzam, że zostały spełnione wymogi formalne i merytoryczne stawiane rozprawom doktorskim, zawarte w Art. 13 obowiązującej ustawy z dn. 14 marca 2003 o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2003 r., nr 65 poz. 595 z późn. zm.)

Na tej podstawie wnoszę do Rady Wydziału Farmaceutycznego z Oddz. Medycyny Laboratoryjnej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie mgr Anny Siekierzyckiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Prof. nadzwyczajny

dr hab. Rafał Bartoszewski

Gdańsk, 21 lutego 2018 roku.