



INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ
im. Ludwika Hirszfelda
POLSKIEJ AKADEMII NAUK
Centrum Doskonałości: IMMUNE
ul. Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław
tel. (+48-71) 337 11 72, (+48-71) 370 99 30 fax: (+48-71) 337 21 71
<http://www.iitd.pan.wroc.pl>

dr hab. Kazimiera Waśniowska, prof. PAN
Zakład Immunochemii
Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN
we Wrocławiu

Wrocław, 21. 04. 2016r.

Recenzja rozprawy doktorskiej
mgr Aleksandry Kuzan pt. „Charakterystyka wybranych czynników i
wskaźników biologicznych, mających udział w degradacji biostruktury ścian naczyń
krwionośnych w przebiegu miażdżycy” wykonanej pod kierunkiem
prof. dr hab. Andrzeja Gamiana

Choroby sercowo-naczyniowe, które są główną przyczyną śmierci w świecie zachodnim mogą wynikać, ze zmian w funkcjonowaniu naczyń krwionośnych spowodowanych zmianami w mikrostrukturze składników naczyń krwionośnych takich jak kolagen elastyna czy komórki mięśniowe. Właściwości biomechaniczne naczyń krwionośnych zależą od ich mikrostruktury dlatego zmiany w budowie białek macierzy zewnątrzkomórkowej ścian naczyń krwionośnych mogą powodować zaburzenie ich biomechanicznych funkcji. Przyczyną takich zmian może być proces starzenia się organizmu jak również niektóre choroby np. miażdżyca, cukrzyca. Zrozumienie jak zmiany chorobowe naczyń krwionośnych mogą wpływać na kolagen i elastynę, białka macierzy zewnątrzkomórkowej, mogą pomóc nam w wyjaśnieniu molekularnego mechanizmu towarzyszącego starzeniu się organizmu i miażdżycy. W tej tematyce mieści się praca doktorska mgr Aleksandry Kuzan pt. „Charakterystyka wybranych czynników i wskaźników biologicznych, mających udział w degradacji biostruktury ścian naczyń krwionośnych w przebiegu miażdżycy” napisana pod kierunkiem prof. Andrzeja Gamiana. Temat pracy podjęty przez doktorantkę jest bardzo ważny i aktualny, o dużych walorach poznawczych i praktycznych.

Praca doktorska mgr Aleksandry Kuzan liczy 226 stron: w tym 197 strony to tekst rozprawy ilustrowany 30 tabelami i 70 rycinami. Pozostałe strony zajmują aktualne piśmiennictwo (krajowe i zagraniczne) streszczenie pracy po polsku i angielsku oraz spis

publikacji i doniesień zjazdowych doktorantki. Praca doktorska ma ogólnie przyjęty dla rozpraw doktorskich układ rozdziałów i ma zachowaną proporcję pomiędzy rozdziałami. Rozdział „Wstęp” jest obszerny i składa się z trzech rozdziałów i kilku podrozdziałów, których treści są adekwatne do zamierzeń części doświadczalnej. W pierwszej części Doktorantka omawia budowę aorty oraz kolagenu i elastyny, głównych białek macierzy zewnątrzkomórkowej biorących udział w utrzymaniu prawidłowego funkcjonowania ścian naczyń krwionośnych. W następnych rozdziałach scharakteryzowane są właściwości biomechaniczne tętnic i patofizjologia powstawania zmian miażdżycowych oraz produkty zaawansowanej glikacji, które również mogą prowadzić do zwiększenia sztywności naczyń krwionośnych. Całość wstępu napisana jest jasno i czytelnie, co świadczy o doskonałej znajomości aktualnego piśmiennictwa, dużej wiedzy i dobrym przygotowaniu do podjętych badań.

Głównym celem pracy, podanym jasno w osobnym rozdziale, było określenie korelacji pomiędzy zawartością kolagenu i elastyny, głównych białek macierzy zewnątrzkomórkowej, i produktów glikacji w wycinkach tętnic a właściwościami biomechanicznymi i stopniem zaawansowania zmian miażdżycowych oraz ustalenie czy istnieje zależność pomiędzy ilością tych białek w tętnicach a wiekiem. Badano również korelację między ilością AGE, wiekiem, stopniem zaawansowania miażdżycy, zawartością kolagenu I- IV, elastyny, proliny i hydroksyproliny oraz wpływ glikacji białek ECM na szybkość migracji i adhezję komórek mięśni gładkich.

Materiałem badanym były 103 fragmenty aort odcinka brzuszego bądź piersiowego pobranym od ludzi zmarłych śmiercią nagłą. Do oznaczania ilościowego głównych białek macierzy zewnątrzkomórkowej w pobranym materiale doktorantka wykorzystwała metody ELISA i chromatografii cieczowej sprzęgniętej ze spektrometrią masową (LC-ESI-MS/MS), kolagen i elastynę oznaczała również metodami immunohistochemicznymi. Do badań produktów glikacji w pobranych tkankach doktorantka zastosowała metodę dot blotingu z wykorzystaniem przeciwciał monoklonalnych skierowanych przeciwko glikowanym białkom otrzymanych w laboratorium profesora Gamiana. Wytrzymałość i elastyczność skrawków tętnic badano w teście jednoosiowego rozciągania. Analizę zdolności migracyjnych linii komórek mięśni gładkich pochodzących z tętnic badano w teście migracyjnym z użyciem membran ThinCrtTM. Wszystkie otrzymane wyniki poddano dogłębnej analizie statystycznej stosując pakiet statystyczny R for Windows (wersja 3.1.2).

Większość metod opisano dokładnie podając pochodzenie odczynników i wyszczególniając stosowaną aparaturę. Niestety brak jest odnośników literaturowych na

podstawie których opracowano metody stosowane w pracy. Metody częściowo zostały opisane w dyskusji pracy i tam też zacytowano część bibliografii. W mojej opinii ta część dyskusji w wersji skróconej powinna być zamieszczona w części metodycznej.

W pierwszej części wyników autorka przedstawia ilościową zawartość i lokalizację różnych typów kolagenu i elastyny a także produktów zawansowanej glikacji we fragmentach tętnic, przedstawia również stopień zwapnienia aort. Kolejne, bardzo ciekawe części wyników dotyczą analizy statystycznej otrzymanych wyników i badania korelacji między właściwościami biochemicznymi i biomechanicznymi badanych próbek. Każdą część wyników Doktorantka kończy wnioskami co znacznie poprawia czytelność tej części pracy i ułatwia czytelnikowi interpretację wyników.

Do najważniejszych osiągnięć doktorantki można zaliczyć:

- Wykazanie, że ilość kolagenu typu III spada w aorcie wraz z rozwojem miażdżycy a wzrasta w depozytach wapnia, jest związana z kalcyfikacją i powoduje zaburzenia w strukturze włókien kolagenowych. Natomiast ilość kolagenu typu II wzrasta wraz z rozwojem miażdżycy i wiekiem osoby od której pochodziła próbka. Nowością tej pracy było wykazanie dużej ilości kolagenu typu IV w czapeczce włóknistej, depozytach wapnia i na granicy media/przydanka w badanych preparatach histologicznych.
- Ustalenie, że w ścianie tętnic ulegają glikacji nie tylko białka macierzy zewnątrzkomórkowej ale także histony przy czym glikacja elastyny jest efektywniejsza niż kolagenu. Wykazano również, że glikacja kolagenu i elastyny otaczających komórki mięśni gładkich hamuje ich migrację z medii do intymy.

Otrzymane wyniki doktorantka poddała krytycznej i wielopłaszczyznowej dyskusji w odniesieniu do wyników własnych oraz uzyskanych przez innych autorów. Wykazała się przy tym bardzo dobrą znajomością piśmiennictwa i szeroką wiedzą w zakresie prowadzonych badań oraz umiejętnością obiektywnej oceny wartości własnych badań.

Wnioski kończące pracę wynikają z przeprowadzonych badań i odpowiadają postawionym celom.

Z obowiązku recenzenta wymienię błędy techniczne, edytorskie i formalne, dostrzeżone w tekście publikacji:

- Brak spisu tabel i rycin, numeracji piśmiennictwa
- Doktorantka cytuje literaturę w tekście pracy w przypadku dwóch autorów publikacji wymieniając tylko jednego autora a nie, jak jest ogólnie przyjęte, obydwu i rok np.

zamiast Jabłońska-Tyruć i wsp. 2007 powinno być Jabłońska-Tyruć i Czerpak 2007 str. 39. Błąd ten powtarzany jest w przypadku wszystkich publikacji dwuautorskich za wyjątkiem jednego cytowania na str. 10 (Hansson i Libby 2006).

- Moim zdaniem doktorantka nieprawidłowo używa słowa trawienie kwasem mrówkowym lub taninowym kolagenu czy elastyny, bardziej odpowiednie byłoby słowo degradacja lub działanie kwasem.
- W pracy dostrzegłam również kilka błędów literowych np. str 44 i brak wyjaśnienia skrótu MB-MFL str.50.

Pracę oceniam bardzo wysoko, a wszelkie drobne uchybienia, wynikające z braku doświadczenia w pisaniu pracy nie umniejszają wartości przeprowadzonych badań.

Wniosek końcowy

Podsumowując ocenę rozprawy doktorskiej stwierdzam, że jest to praca oryginalna, solidnie wykonana, zawierająca istotne elementy nowości naukowej, uzyskane wyniki stanowią podstawę do dalszych badań laboratoryjnych i klinicznych. Wypływające z badań Doktorantki wnioski mogą w znaczący sposób przyczynić się do zaprojektowania strategii diagnostycznych i terapeutycznych mających na celu kontrolę zawartości białek macierzy zewnątrzkomórkowej w tętnicach i poziomu ich glikacji. Doktorantka wykazała wszechstronną znajomość omawianych zagadnień, samodzielność myślenia oraz bardzo dobre opanowanie warsztatu badawczego. Biorąc pod uwagę aktualność tematu, wartość poznawczą pracy, staranną dokumentację wyników badań, z których część była prezentowana przez doktorantkę na konferencjach krajowych i zagranicznych stawiam wniosek o **wyróżnienie pracy**.

Uważam, że rozprawa doktorska mgr Aleksandry Kuzan spełnia warunki określone w art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U.Nr 65, poz. 595, z późn.zm.) i wnioskuję do Wysokiej Rady Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu o przyjęcie tej pracy doktorskiej i dopuszczenie doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Kazimiera Waśniowska