

<p>Katedra i Zakład Biochemii i Biologii Molekularnej Uniwersytet Medyczny w Lublinie Lublin 20-093 ul. W. Chodźki 1 tel./fax (081) 448 6350</p> <p><i>Kierownik Prof. dr hab. n. med. Andrzej Stepulak</i></p>		<p>Department of Biochemistry and Molecular Biology Medical University of Lublin Poland, Lublin 20-093 ul. W. Chodźki 1 tel./fax (00-48-81) 448 6350</p> <p><i>Head of Department Andrzej Stepulak M.D., Ph. D.</i></p>
------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----------------------------------------------------------------------------------	--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Lublin, dn. 06.06.2016 r.

Ocena rozprawy doktorskiej mgr Aleksandry Kuzan

pt. „Charakterystyka wybranych czynników i wskaźników biologicznych, mających udział w degradacji biostruktury ścian naczyń krwionośnych w przebiegu miażdżycy”

Miażdżyca naczyń jest wyzwaniem współczesnej medycyny. Mimo ogromnego postępu zapobieganie i leczenie farmakologiczne tej patologii nie przynosi oczekiwanych, dobrych rezultatów. Dlatego podejmowanie badań dotyczących patomechanizmu miażdżycy chorób jest ze wszech miar wskazane.

W ten nurt badań wpisuje się przedłożona do oceny rozprawa Pani Aleksandry Kuzan. Stanowi ona raport z badań Autorki dotyczących ustalenia zależności pomiędzy składem i zawartością białek macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM) będących składnikami ścian naczyń krwionośnych a ich własnościami biomechanicznymi, jak również określenia korelacji składu szeregu białek ECM a takimi wskaźnikami klinicznymi jak wiek pacjentów, czy morfologiczny stopień zaawansowania choroby w wycinkach tętnic pobranych *post mortem*. Doktorantka dokonała również analizy wpływu glikacji białek ECM na proces migracji komórek mięśni gładkich tętnic w warunkach *in vitro*. Mgr Aleksandra Kuzan wykonała ogromną ilość różnego typu bardzo pracochłonnych analiz i eksperymentów, których liczba i rodzaj wykraczają znacznie poza ramy przyjęte zazwyczaj dla prac doktorskich. Zwraca również uwagę interdyscyplinarność podjętych badań, co świadczy o wszechstronnych zainteresowaniach i umiejętnościach badawczych Doktorantki.

Rozprawa doktorska o typowym układzie dla prac doświadczalnych liczy 226 stron i została podzielona na 5 rozdziałów, zawiera streszczenia pracy w języku polskim i angielskim oraz piśmiennictwo, jak również dorobek naukowy Doktorantki – tego typu fragment jest dość rzadko widywany jako część składowa monografii doktorskiej. Tekst uzupełniony został 30 tabelami i 70 rycinami. Strona graficzna rozprawy i dokumentacja przeprowadzonych eksperymentów zasługuje na szczególne wyróżnienie. Praca została wzbogacona o **Wykaz używanych skrótów** i symboli stanowiące użyteczny dla czytelnika odnośnik do tekstu. Nie znalazłem natomiast wyróżnionego ważnego składnika pracy doktorskiej, jakim są wyraźnie zaakcentowane **Wnioski**, wynikające z

całokształtu rozprawy. Są one obecne jedynie w streszczeniach pracy – w liczbie 8. W głównym tekście rozprawy – w rozdziale nr 4 **Wyniki** pojawiają się natomiast wielokrotnie fragmenty tekstu zatytułowane „wnioski” w postaci swobodnego tekstu (strony 94, 101, 105, 111, 116, 122, 147), które w mojej opinii są raczej streszczeniem uzyskanych wyników z pewną dozą dotyczącego ich wnioskowania. Tego typu numerowane „wnioski” w liczbie 7 pojawiają się również na stronie 86 tego samego rozdziału (nr 4 **Wyniki**), są one jednak różne od tych prezentowanych w streszczeniach. Wymagałaby to pewnego usystematyzowania.

Wstęp zawarty na stronach 10-42 zawiera aktualne dane na temat epidemiologii, etiologii i patogenezы miażdżycy tętnic. W tym rozdziale rozprawy doktorskiej dokonano szczegółowej charakterystyki budowy morfologicznej, histologicznej i biochemicznej aorty z uwzględnieniem rodzaju oraz funkcji różnego typu białek ECM. Szczegółowo omawiana jest też patofizjologia zmian miażdżycowych w tętnicach, obecnie obowiązująca hipoteza zapalnego tła powstawania zmian miażdżycowych, rola migracji komórek mięśni gładkich w tym procesie przy udziale specyficznych wewnątrzkomórkowych szlaków sygnałowych, jak również homeostaza białek ECM w obrębie blaszki miażdżycowej. Istotną częścią **Wstępu** jest też próba wyjaśnienia roli produktów zaawansowanej glikacji (AGE) w miażdżycy tętnic oraz przebiegu i znaczenia procesu kalcyfikacji w tej patologii. „**Wstęp**” jest obszernym i przejrzystym wprowadzeniem w problematykę **zagadnień** podejmowanych w rozprawie doktorskiej. Na końcu prawie każdego podrozdziału znajduje się fragment tekstu stawiający nierozwiązane do tej pory pytania dotyczące omawianego zagadnienia, będący jednocześnie uzasadnieniem podejmowanych działań badawczych, czy też - jak np. na stronie 20 – Autorka rozprawy deklaruje zbadanie dyskusyjnych wyników prezentowanych w dotychczasowym piśmiennictwie. Po stosownej modyfikacji rozdział ten mógłby być opublikowany jako ciekawa praca poglądowa.

Cel pracy dotyczy ważnego wątku badań poszukującego czynników patogenetycznych miażdżycy tętnic na poziomie zaburzeń biochemicznych, zmian morfologicznych i związanych z nimi właściwości biomechanicznych izolowanych fragmentów aorty. Wybór tematu badań i sposobów jego realizacji nie budzi zastrzeżeń. Zasadność ich podjęcia potwierdza fakt, że są one fragmentem większego projektu finansowanego ze środków UE.

Material i metody stosowane w pracy zostały opisane w rozdziale 3. Konstrukcja badania jest czytelna i wyraźnie akcentuje kryteria włączenia analizowanych skrawków aort ludzkich otrzymanych *post mortem*. Badaniami objęto grupę 103 aort otrzymanych od osób w wieku 55±15 lat, podzielonych na grupy zależnie od klasyfikacji miażdżycy wg Stary i wsp. Dodatkowy podział na takie aorty, które zawierały ogniska kalcyfikacji oraz te, które ich nie zawierały, jak również izolacja i preparatyka depozytów kalcyfikacji do dalszych badań należy uznać za wybitną dbałość doktorantki o dobór materiału do badań biochemicznych.

Również przedstawiony wiek analizowanych chorych, stanowi głęboko przemyślane kryterium umożliwiające prawidłową ocenę badanych parametrów. O ile to możliwe, to w przyszłości sugerowałbym włączenie do badań (szczególnie biomechanicznych) materiału od osób młodszych (20-30 lat), aby utworzyć grupę „kontrolną”, u których miażdżycy nie występuje, bądź występuje w minimalnym zakresie. Na przedstawionym na ryc. 11 diagramie wynika, że tylko pojedyncze osoby zakwalifikowane do badań były poniżej 50 roku życia. Bardziej informacyjne byłoby też przedstawienie w/w danych również w formie tabeli. Uzyskane komercyjnie komórki mięśni gładkich użyte do badań *in vitro*, były z kolei wyprowadzone od osoby młodej – 23-letniej.

Tym niemniej, nieczęsto spotykany staranny dobór grupy badawczej mający na celu eliminację niespecyficznych czynników mogących mieć wpływ na otrzymane wyniki uważam za bardzo wartościowy aspekt pracy doktorskiej mgr Aleksandry Kuzan.

Zastosowana metodyka jest adekwatna do wytyczonego celu i spełnia wymogi nowoczesności wymagane w badaniach z zakresu biochemii. Zwraca uwagę różnorodność zaawansowanych metod badawczych użytych w pracy doktorskiej – od preparatyki i oceny histologicznej oraz immunocytochemicznej, poprzez metody typowo biochemiczne – jak Dot-bloting, ELISA, testy cytotoxyczości i migracji komórek – do metod analitycznych (LC-ESI-MS/MS), a na badaniach biomechanicznych kończąc. Niektóre z tych eksperymentów i analiz były bardzo pracochłonne i długotrwałe (np. dotyczące glikacji), w zdecydowanej większości przypadków zawierały odpowiednie eksperymenty czy próby kontrolne, pozwalające uniknąć generacji wątpliwych wyników.

Na stronie 50 (dot-bloting) brak mi charakterystyki użytych przeciwciał I-rzędowych, tym bardziej, że są to przeciwciała niekomercyjne, a ich opis znalazłem dopiero na stronie 153 – w **Dyskusji**, który powinien się znaleźć raczej w rozdziale **Metodyka**. W ocenie testu migracyjnego (str. 63) „zliczano 5 reprezentacyjnych pól widzenia”, nie precyzując na czym ocena ta się opiera, co może zawierać pewną dozę subiektywności tego typu oceny. W przyszłości Doktorantka mogłaby rozważyć użycie przeciwciał II-rzędowych znakowanych fluorescencyjnie, a następnie ocenić intensywność fluorescencji z całości analizowanej powierzchni przy pomocy mikroskopu fluoroscencyjnego lub konfokalnego i odpowiedniego oprogramowania.

Analiza statystyczna nie budzi zastrzeżeń. Przyjęte testy statystyczne nie odbiegają od standardów światowych, a ich wybór należy uznać za odpowiedni.

Wyniki wykonanych pomiarów przedstawiono w sposób czytelny i jasny ułatwiający czytelnikowi dysertacji poruszanie w licznych i złożonych analizach zależności. Autorka dokonała bardzo wielu korelacji badanych parametrów, uwzględniając również wiek i płeć. Dane te zostały starannie zobrazowane w postaci licznych tabel i wykresów z zaznaczonymi wynikami analizy statystycznej. Za bardzo interesujące odkrycia Doktorantki uważam fakt występowania kolagenu IV w czapeczce włóknistej i depozytach kalcyfikacji, jak również to, że elastyna ulega glikacji łatwiej

niż kolagen. Wyniki są ciekawe i nie budzą zastrzeżeń. Mam jedynie pojedyncze uwagi i sugestie. Na stronie 86 Doktorantka w punkcie 6 formułuje tezę, że AGE występuje w ko-lokalizacji z białkami ECM, podpierając ją wynikami zwykłego barwienia histologicznego. Prawdopodobnie tak jest, ale aby to jednoznacznie udowodnić powinna wykonać barwienia używając przeciwciał II-rzędowych ze znacznikami fluorescencyjnymi przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego lub konfokalnego. Sformułowanie „obserwuje się przebieg włókienkowy białka” – w punkcie 5 na tej samej stronie jest trochę niezręczne.

Tym niemniej, wyniki doświadczeń przeprowadzonych przez mgr Aleksandrę Kuzan stanowią cenne uzupełnienie wiedzy o patogenezie miażdżycy tętnic.

Dyskusja przedstawionej do recenzji dysertacji świadczy o swobodnym poruszaniu się Autorki w zagadnieniu będącym przedmiotem rozprawy doktorskiej. Została podzielona na szereg podrozdziałów, często bardzo krótkich, zajmujących czasami tylko pół strony, co jest rzadko spotykane w pracach doktorskich. Myślę, że niektóre z nich można byłoby połączyć – np. te dotyczące metodyki. Tym bardziej, że tytuły niektórych z nich są praktycznie tożsame z podrozdziałami z **Metodyki** (przykładowo: 3.2.5 i 5.1.1.1; czy 3.2.1 i 5.1.1.4 oraz 3.2.4 i 5.1.1.4). Pewną ciekawostką jest dla mnie również podrozdział podsumowujący raz jeszcze **Dyskusję** (nr 5.8). Nie do końca się też mogę zgodzić z opinią, że immunobloting jest metodą ilościową (strona 151 – początek rozdziału 5.1.1.4). Moim zdaniem jest to metoda najwyżej półilościowa, a i to tylko w pewnych warunkach. Tym niemniej zawarte w dyskusji informacje w sposób rzeczowy i wiarygodny porównują uzyskanie wyniki z danymi zaczerpniętymi z piśmiennictwa. Na szczególną uwagę zasługuje krytyczne podejście autorki do wyników własnych oraz do tych opisywanych w piśmiennictwie. Rozdział ten jest cennym składnikiem rozprawy.

Piśmiennictwo zawierające aż 363 pozycje jest chyba zbyt obszerne. Niektóre pozycje książkowe, w dodatku sprzed kilkunastu lat - np. Żak – 2001 (nr 360), czy Zabel 2000 Histologia (nr 359), Pawlikowski T. podręcznik Histologii 1981 (nr 245) mogłyby być usunięte bez żadnych następstw dla pracy, tym bardziej, że w przypadku tych ostatnich pozycji istnieje w zamieszczonym piśmiennictwie znacznie nowsza pozycja – Sawicki W. Histologia z roku 2014 (nr 282). Podobnie, cytowanych jest kilka podręczników biochemii. Niektóre pozycje są trudno dostępne dla czytelnika – jak np. pozycja nr 26 Bednarz- Misa – skrypt dla studentów, czy napisane w języku chińskim – Lu WD. 2007 (nr 184), co stawia pod znakiem zapytania możliwość ich wnikliwej analizy. Pozycja nr 22 (Bartens W.) powinna być uzupełniona o rok jej wydania.

80 pozycji piśmiennictwa pochodzi z ostatnich 5 lat (2011-2015), jednak dość duża jego część jest starsza niż 20 lat, co wzbudza wątpliwości co do zasadności cytowania niektórych z nich poza tymi, które posiadają kluczowe znaczenie dla redakcji pracy lub zawierają oryginalne opisy stosowanych metod badawczych. Użyteczne byłoby również ponumerowanie pozycji piśmiennictwa, umieszczonych w bibliografii.

Z obowiązku recenzenta muszę zwrócić uwagę na pewne niedopowiedzenia, lub drobne pomyłki w tekście, czy też użycie sformułowań zaczerpniętych z żargonu laboratoryjnego - na przykład: „ekspresjonowane” są MMP (raczej – MMP ulegają ekspresji...); czy komórki „ekspresjonujące” kolagen (str. 34); „epitalizacja” na str. 184; kolumna była „termostatowana” (str. 53); przeniesienie do „ependorfek” (str. 53); próbki tętnic „odlipidowywano” (str. 53) i tym podobnych. Nazwy genów powinny być pisane kursywą.

Przedstawione uwagi w niczym nie umniejszają jednak wartości recenzowanej rozprawy doktorskiej, którą oceniam wysoko. W zdecydowanej większości dotyczą one zagadnień typowo technicznych, które mogą być łatwo skorygowane, bądź uzupełnione przy przygotowywaniu wyników do publikacji w renomowanych czasopismach naukowych.

Konkludując stwierdzam, że przedmiot prowadzonych badań, dobór metod, prezentacja wyników, rzeczowość dyskusji odpowiadają kryteriom stawianym pracom doktorskim określonym w art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 z późn. zm.).

Na szczególne podkreślenie zasługuje podjęta tematyka badań, biegłość Doktorantki w wykorzystaniu przedstawionych metod oraz dojrzała analiza uzyskanych wyników.

W związku z powyższym,
przedkładam Wysokiej Radzie
Wydziału Lekarskiego
Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu
wniosek o dopuszczenie mgr Aleksandry Kuzan
do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Równocześnie proponuję wyróżnienie pracy doktorskiej mgr Aleksandry Kuzan.

Lublin, 06.06.2016



Prof. dr hab. n. med. Andrzej Stepulak
Uniwersytet Medyczny w Lublinie

