

**Ocena rozprawy doktorskiej mgr Dagmary Michałowskiej, zatytułowanej:**  
**„Identyfikacja czynników proangiogennych i mechanizmów ich regulacji o potencjalnym  
znaczeniu w rozwoju krytycznego niedokrwienia kończyn dolnych”**

Oceniana rozprawa doktorska **mgr Dagmary Michałowskiej** opisuje czynniki i mechanizmy ich regulacji, mogące mieć znaczenie w patomechanizmie krytycznego niedokrwienia kończyn dolnych (CLI, critical limb ischemia).

Badania eksperymentalne, prezentowane w pracy wykonano w Zakładzie Technik Molekularnych Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu. Promotorem pracy jest prof. dr hab. Tadeusz Dobosz.

Rozprawa obejmuje 168 stron maszynopisu. Układ tekstu jest tradycyjny, zawiera 31-stronicowy **Wstęp i Cel Pracy**, a także **Materiały i Metody** (26 stron), **Wyniki** (48 stron), zakończone **Dyskusją i Wnioskami**, oraz 279 pozycji **Piśmiennictwa**. Rozprawa zawiera także spis ilustracji i tabel.

**Wstęp** stanowi przedstawienie aktualnego stanu wiedzy dotyczącego procesu angiogenezy - procesu powstawania nowych naczyń krwionośnych, a w szczególności angiogenezy indukowanej hipoksją. Następna część przedstawia charakterystykę głównego czynnika warunkującego powstawanie i odbudowę naczyń – VEGF-A. Szczególną uwagę we wstępie zwrócono na znane obecnie czynniki wpływające na regulację poziomu ekspresji VEGF, takie jak czynniki transkrypcyjne, cząsteczki mikroRNA i cytokiny. Dodatkowo uwzględnionym czynnikiem epigenetycznym była metylacja DNA.

W dalszej części wstępu przedstawiono charakterystykę krytycznego niedokrwienia kończyn dolnych, choroby przewlekłej na tle miażdżycowym. Rosnąca średnia długość życia powoduje wyraźny wzrost liczby pacjentów. Szacuje się, że nawet 10% populacji ludzkiej zapada na tę chorobę. Jedną z przyczyn rozwoju CLI jest dysfunkcja śródbłonnków w kończynach objętych chorobą, wydaje się więc, że zastosowanie czynników poprawiających proliferację i funkcje komórek śródbłonna mogłoby doprowadzić do ewentualnego zahamowania rozwoju choroby. Podjęty w pracy doktorskiej temat oprócz informacji o charakterze czysto poznawczym może potencjalnie służyć także do wysnucia wniosków co do postępowania terapeutycznego.

Przedstawione we wstępie zagadnienia zostały potraktowane bardzo wnikliwie, jednakże wydaje się, że zamieszczenie dodatkowych schematów, np. samego procesu angiogenezy ułatwiłoby zrozumienie opisywanych procesów na poziomie komórkowym. Dane przedstawione we wstępie są

bogato podparte cytowaniami piśmiennictwa (ponad 200 pozycji), co wskazuje także na obszerność i aktualność tematu.

**Celem pracy** jest identyfikacja czynników i mechanizmów ich regulacji, mogących mieć znaczenie w patomechanizmie krytycznego niedokrwienia kończyn dolnych. Spośród siedmiu celów szczegółowych znakomita większość dotyczy mało poznanego dotąd zjawiska metylacji DNA, w tym metylacji promotora dla VEGF-A.

Rozdział **Materiały i Metody** opisuje rodzaje materiałów stosowanych w badaniach (fragmenty naczyń pozyskane od pacjentów z CLI oraz linie komórek śródbłonna i progenitorów śródbłonna hodowane *in vitro*), zastosowane metody hodowli i badań funkcjonalnych komórek. Szczegółowo omówione zostały metody izolacji i badania ekspresji RNA, białek, a także ocena poziomu metylacji DNA.

**Wyniki** przedstawiono w sposób niekonwencjonalny: każdy punkt opisanych wyników zakończony jest krótkim podsumowaniem. Ułatwia to znacznie analizę przedstawianych wyników.

Pierwszą część wyników stanowi przedstawienie ekspresji genów we fragmentach naczyń (tętnice podkolanowe) pobranych od 21 pacjentów i 3 zdrowych dawców z pobrań wielonarządowych. Ekspresja genów została oceniona przy użyciu metody PCR w czasie rzeczywistym w technologii kart mikrocieczowych TLDA. U pacjentów z CLI stwierdzono podwyższony poziom ekspresji czynników prozapalnych (IFNB1, IL12A, INFG), opisywanych zwykle jako inhibitory angiogenezy. Nie wykazano zmian w ekspresji głównego czynnika proangiogenego VEGF-A, natomiast poziom ekspresji VEGF-B wzrastał ponad 20 razy. Nie wykazano także zmian w ekspresji innych czynników proangiogenych (HGF, PTGIS, HIF1A). Wyniki przedstawione w tabeli 14 wydają się bardzo interesujące, jednakże po dokładnej analizie wątpliwości wzbudza wielkość uzyskiwanych rozrzutów, np. dla genu IFNB1 u pacjentów z CLI ponad 400% wartości odchylenia standardowego, co skutkuje brakiem istotności statystycznej dla ponad 30-krotnej różnicy ekspresji genu! Być może rozwiązaniem byłby podział grupy pacjentów na takich z podwyższoną ekspresją i bez podwyższonej ekspresji danego genu. Problemатyczne wydaje się także zastosowanie bardzo precyzyjnej metody badawczej do bardzo niewystandaryzowanego materiału jakim są fragmenty naczyń uzyskane od pacjentów, jako że najprawdopodobniej fragmenty te mogą nie zawierać komórek śródbłonna, który jak rozumiem był interesujący dla doktorantki.

W kolejnym etapie badania koncentrowały się głównie na ekspresji genów proangiogenych. Z około 100 genów przebadanych uprzednio wybrano 18, a badania przeprowadzono na zwiększonych grupach osób. Uzyskane wyniki zasadniczo potwierdziły tendencje opisane w

poprzednim badaniu, u pacjentów nie stwierdzono aktywacji czynników proangiogennych ani ich receptorów.

Zbadano także poziom ekspresji cząsteczek mikroRNA, mogących uczestniczyć w regulacji ekspresji cytokin proangiogennych. U pacjentów z CLI stwierdzono podwyższony poziom ekspresji cząsteczek mikroRNA, które mogą obniżać poziom ekspresji czynnika VEGF-A (miR93, miR 126 i miR29c). Z uwagi na fakt, że miR29c może regulować także ekspresję metylotransferaz, w dalszej części pracy badano wpływ metylacji DNA na regulację ekspresji VEGF-A. Doktorantka wykazała zwiększony stopień metylacji promotora VEGF-A, co może być przyczyną obserwowanego obniżenia ekspresji genu VEGF-A.

Dalsza część pracy to badania przeprowadzone na modelowych ludzkich liniach komórkowych śródbłonka i progenitorów śródbłonka, dotyczące głównie regulacji poziomu ekspresji VEGF-A pod wpływem czynników zmieniających poziom metylacji DNA i/lub hipoksji. Najbardziej interesujące wydają się następujące wyniki doświadczeń:

1. Hipoksja wyraźnie podwyższa poziom metylacji DNA w obydwu typach komórek.
2. Hodowla komórek progenitorów śródbłonka w obecności czynników wpływających na poziom metylacji DNA zmieniała ekspresję mRNA dla kilku czynników proangiogennych. S-adenozylometionina (czynnik zwiększający metylację) obniżała poziom mRNA dla FGF2, a 5-aza -deoksycytydyna (inhibitor metylacji) znacznie podwyższała poziom HGF.
3. W komórkach hodowanych w obecności 5-aza -deoksycytydyny zmieniał się także *in minus* poziom cząsteczek kilku typów regulatorowego mikroRNA. Przeciwnie, pod wpływem VEGF-A poziom większości mikroRNA ulegał podwyższeniu.
4. Stosując w hodowli jednocześnie hipoksję i czynniki wpływające na poziom metylacji DNA można było wykazać ich addytywny pozytywny wpływ na produkcję czynnika wzrostu dla komórek śródbłonka –VEGF-A (zarówno na poziomie mRNA, jak i białka).

Doktorantka wykazała także, że pod wpływem czynników zmieniających poziom metylacji DNA i/lub hipoksji zmianie ulegają funkcje komórek śródbłonka, takie jak ich zdolność do migracji i do tworzenia pseudokapilar w teście z użyciem Matrigelu. Zastrzeżeniem do tej części pracy jakość załączonych zdjęć ww. procesów. Natomiast godny pochwały jest wysiłek doktorantki podjęty w celu ilościowej/precyzyjnej oceny tworzenia pseudokapilar w teście Matrigelowym.

Testy funkcjonalne, przeprowadzone na komórkach śródbłonka i progenitorach śródbłonka, sugerują, że zmieniając warunki utlenowania tkanki, poziom metylacji DNA komórek śródbłonka czy poziom czynnika VEGF-A w tkance objętej procesem chorobowym, można potencjalnie

poprawić stan tkanek i narządów pacjenta. Stanowić to może punkt wyjścia do dalszych badań tego zagadnienia.

W **Dyskusji** doktorantka omawia uzyskane wyniki konfrontując je z dostępnymi danymi literaturowymi. Zdaje sobie przy tym sprawę z istotnych ograniczeń w prowadzonych przez nią badaniach, przede wszystkim ze wspomnianego już niewystandaryzowanego materiału, jakim były fragmenty tkanek uzyskane od pacjentów, które, jak sama przyznaje, były mieszaniną różnego typu komórek pełniących odmienne funkcje angiogenne w organizmie. Szczególną uwagę doktorantka zwróciła na zagadnienie metylacji DNA i jego wpływu na właściwości angiogenne komórek śródbłonna i progenitorów śródbłonna, stanowiącego istotną część pracy. Natomiast stosunkowo mało uwagi poświęciła ocenie testów funkcjonalnych przeprowadzonych na tych komórkach. Po **Dyskusji** zostało przedstawionych 9 końcowych **Wniosków** pracy.

Ostatni rozdział rozprawy doktorskiej stanowi **Piśmiennictwo** obejmujące 279 pozycji, z których ponad jedna trzecia pochodzi z ostatnich pięciu lat. Rozprawa zakończona jest **Spisem ilustracji i tabel**.

Odnosząc się do strony językowej rozprawy doktorskiej recenzent pragnie zauważyć, że należy unikać stosowania określeń: „globalna”, „totalna” i „całkowita” metylacja na opisanie tego samego zjawiska oraz wyrażenia: „efektem stymulacji jest obniżenie” (str. 106). Wątpliwości recenzenta budzi także używanie określeń typu „stymulowanie komórek czynnikami zmieniającymi metylację w warunkach hipoksji”, ponieważ z pracy wynika, że komórki były stymulowane czynnikami przez 72 godziny w normoksji, a **po stymulacji** komórki umieszczano w hipoksji na kolejne 24 godziny.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska jest napisana przejrzysto i zrozumiale, a wyciągnięte na podstawie badań wnioski są zasadniczo prawidłowe. Nieliczne mankamenty zaobserwowane w pracy nie mają wpływu na jej pozytywną ocenę. Praca doktorska odpowiada warunkom określonym w art. 13 Ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki z dnia 14 marca 2003 r. (Dz.U.2003 nr 65 poz. 595 z późniejszymi zmianami). Dlatego wnoszę do Wysokiej Rady Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu o dopuszczenie **mgr Dagmary Michałowskiej** do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

DYREKTOR INSTYTUTU

  
prof. dr hab. Danuta Duś