

Poznań, 26 listopada 2014 r.

R E C E N Z J A

**rozprawy doktorskiej mgr analityki medycznej Dągmary MICHAŁOWSKIEJ
z Zakładu Techniki Molekularnych
Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu**

**pt. Identyfikacja czynników proangiogennych i mechanizmów ich regulacji
o potencjalnym znaczeniu w rozwoju krytycznego niedokrwienia kończyn dolnych**

Problem krytycznego niedokrwienia kończyn dolnych jest niezwykle istotny nie tylko z punktu widzenia medycyny klinicznej, ale również z perspektywy badań podstawowych. O ważkości zagadnienia może świadczyć nie tylko zainteresowanie badaczy, ale również kampanie medialne, w których zwraca się uwagę na szybką diagnostykę oraz działanie w przypadku podejrzenia ostrego niedokrwienia kończyn. Działanie to, aby było skuteczne, musi się opierać o odpowiednią edukację pacjentów, wyczerpanie lekarzy pierwszego kontaktu, jak i stały rozwój badań (zarówno tych o charakterze podstawowym, jak i wdrożeniowych), które zaowocują w przyszłości bardziej precyzyjnym rokowaniem oraz personalizacją leczenia. Na tym tle rozprawa doktorska p. mgr analityki medycznej Dągmary Michałowskiej jawi się jako niezwykle aktualne i ważne opracowanie naukowe, którego elementy poznawcze będą mogły stać się przyczynkiem do tworzenia nowych protokołów diagnostyczno-terapeutycznych już w najbliższej przyszłości.

Przedstawiona mi do oceny praca ma układ typowy. Składa się ze wstępu, celów, materiałów i metod, wyników, ich omówienia oraz wniosków. Rozprawę rozpoczyna streszczenia (w języku polskim i angielskim) oraz wykaz stosowanych skrótów. Niezwykle wartościowym dodatkiem jest zestawienie tabel i rycin (wraz z podaniem numerów stron), które zostało podane w końcowej części rozprawy. Bibliografia obejmuje blisko 300 pozycji literaturowych w ogromnej większości opublikowanych w ostatnich 10 lat. Fakt ten raz jeszcze dowodzi aktualności podjętej tematyki badawczej.

Pierwszy rozdział rozprawy - wstęp, stanowi swoiste kompendium wiedzy w obszarze krytycznego niedokrwienia kończyn dolnych. Wskazuje on na doskonale przygotowanie Doktorantki do podjęcia tego tematu badawczego. Uwagę zwraca bardzo duża liczba przytoczonych prac źródłowych, które, z jednej strony stanowią potwierdzenie dla złożoności podjętej problematyki badawczej, a z drugiej wydają się potwierdzać ciągły brak konsensusu między poszczególnymi zespołami badawczymi w zakresie rozumienia patogenezy choroby. Mogłoby się wydawać, że w aspekcie zmian towarzyszących niedokrwieniu tkanek wiadomo już wszystko lub, przynajmniej, bardzo wiele. Czyż nie ma bardziej prostego modelu niedokrwienia, niż układ składający się z jednego naczynia odżywczego (w tym przypadku tętnicy podkolanowej) oraz zależnych od niej obwodowych tkanek? Okazuje się jednak, że zmiany obserwowane zarówno w samym naczyniu, jak i w ulegającym niedokrwieniu tkankach w modelu niedokrwienia kończyny dolnej, odbiegają nie tylko od naszych oczekiwań, ale są wręcz zaprzeczeniem zdroworozsądkowego podejścia do przeciwdziałania skutkom ostrego (lub też postępującego w czasie) niedotlenienia. Jak bowiem wytłumaczyć fakt, że w wyniku niedrożności tętnic kończyny dolnej nie dochodzi w jej obrębie do wzrostu ekspresji białek odpowiedzialnych za powstawanie nowych naczyń? Istnieje w tej kwestii wiele hipotez. Jedne są bardziej, inne mniej przekonujące. Dostrzega to zresztą sama Doktorantka, przytaczając na stronie 49 wstępu informację, że przewlekły proces zapalny towarzyszący niedrożności tętnicy, hamuje szpik kostny, który to uwalnia na obwód mniej komórek CD34+. W mojej opinii, i zapewne w opinii p. mgr Dagmary Michałowskiej, sytuacja powinna być całkiem odwrotna!

Niejednoznaczność zaprezentowanych we wstępie stanowisk różnych zespołów badawczych w zakresie etiologii krytycznego niedokrwienia kończyn jest bardzo dobrym punktem wyjścia do podania celów pracy doktorskiej. Cele te zostały podane w sposób zwarty i precyzyjny, a podstawowy cel badawczy, jaki postawiła przed sobą Doktorantka, to poznanie (lub też przybliżenie) przynajmniej jednego mechanizmu regulującego atypową ekspresję czynników proangiogennych w niedokrwionej kończynie - metylację odcinka promotorowego genu dla VEGF-A.

Informacje dotyczące przyjętej metodyki zostały podane w sposób całkowicie wyczerpujący. Na uznanie zasługuje przytoczenie w pierwszej części tego rozdziału spisu wykorzystanych odczynników, co w znacznym stopniu ułatwia dalsze nawigowanie w tej części dysertacji. Opis zastosowanych metod badawczych dowodzi skrupulatności Doktorantki w prowadzeniu prac badawczych oraz gwarantuje możliwość powtórzenia doświadczeń przez niezależne

zespoły badawcze. Układ prac badawczych obejmował w pierwszym rzędzie wykonanie badań o charakterze przesiewowym, które umożliwiły wyodrębnienie genów kandydujących do dalszych analiz dotyczących badania stopnia ich ekspresji. W tym celu wykorzystano swoiste macierze ekspresyjne oparte na autorskim przygotowaniu karty mikrofluidycznej zawierającej niemalże 100 starannie wyselekcjonowanych primerów. Działanie takie dowodzi dużej pracowitości oraz sumienności Doktorantki. Przecież znacznie łatwiej można byłoby kupić gotowe zestawy do analizy poziomu ekspresji genów, jakich w ofercie firmy Applied Biosystem znajduje się przecież wiele. Ale doskonale zdajemy sobie sprawę z faktu, że gotowe macierze ekspresyjne zawierają, z reguły, kilkanaście interesujących badacza primerów i kilkadziesiąt (albo i więcej) takich, których wykorzystanie do niczego się nie przyda. Zatem na podstawie ocenianej pracy doktorskiej, Doktorantkę, jak i zespół, w którym pracuje, pochwalić należy nie tylko za sumienność, ale również za rzadko spotykaną w sektorze publicznym gospodarność. Dalsze etapy pracy badawczej obejmowały badanie mechanizmów regulacji ekspresji genu dla VEGF-A w układzie potencjalnej metylacji odcinków promotorowych tego genu w układzie wykorzystującym dwie linie komórek hodowlanych.

Uzyskane wyniki zaprezentowano w postaci wyczerpujących opisów, tabel, rycin i wykresów. Wymienione przeze mnie elementy graficzne pracy są w zasadzie samonośne, tzn. ich zrozumienie nie wymaga szukania instrukcji czy też wyjaśnień w tekście. Zabrakło mi jednakże dodatkowego rozwinięcia skrótów użytych w tabelach, czy też rycinach, które mogły być umieszczone w dolnej ich części. Ponadto, w wykorzystanym w pracy modelu badawczym nie zaproponowano oceny gęstości naczyń krwionośnych w obszarze niedokrwnionym. Wydaje się, że w układzie, w którym amputacji była poddawana cała kończyna, pozyskanie takiego materiału byłoby stosunkowo łatwe. Co więcej korelacja wyników uzyskanych z tkanek tętnicy z wynikami uzyskanymi z obwodu mogłaby rzucić dodatkowe światło na odbiegający od oczekiwań profil ekspresji genów w zatorowym naczyniu. Tak czy inaczej, w każdej niemal pracy można zaproponować wykonanie jeszcze dodatkowych analiz. Nie oznacza to, że wyniki uzyskane w ocenianej przeze mnie rozprawie są niewystarczające lub mało wiarygodne. Absolutnie nie! Uzyskane wyniki są niezwykle cenne, zobiektywizowane przy użyciu odpowiednich testów statystycznych oraz prawidłowo udokumentowane.

W części dotyczącej omówienia wyników, mgr Dagmara Michałowska wykazuje się podziwu godną skrupulatnością w krytycznej analizie uzyskanych rezultatów oraz przytoczeniem

wcześniejszych opracowań innych autorów z tego zakresu. Poszczególne wyniki komentowane są z zachowaniem chronologii ich przedstawienia w wynikach. Autorka opracowania wskazuje istniejące rozbieżności w literaturze tematu oraz, co równie cenne, podaje ograniczenia płynące ze stosunkowo niewielkiej grupy badanej. W mojej opinii, ograniczenia te nie są istotne. Publikowane są przecież prace badawcze, w których wykonuje się badania przesiewowe na grupie zaledwie kilkunastu osób, a następnie rozwija temat w warunkach hodowli *in vitro*. Zatem liczba włączonych do badania osób w rozprawie doktorskiej p. mgr Michałowskiej jest ponadstandardowa (czytaj absolutnie wystarczająca). Co więcej, uzyskane wyniki dotyczące warunków metylacji odcinka promotorowego dla genu VEGF-A wydają się być przełomowe dla podjęcia dalszych prac badawczo-rozwojowych. Być może nie zakończą się one przygotowaniem nowych wytycznych terapii lub też powstaniem innowacyjnych leków, ale mogą stanowić istotną cegiełkę w kompleksowym zrozumieniu warunków towarzyszącym krytycznemu niedokrwieniu kończyn.

W oparciu o przedstawioną wyżej opinię należy wnioskować, że mgr analityki medycznej Dagmara Michałowska udowodniła w ocenianej przez mnie rozprawie doktorskiej bardzo dużą znajomość opracowywanego tematu, swobodę w wykorzystywaniu narzędzi badawczych, wysoką elokwencję w krytycznej analizie rezultatów oraz zdolność do ostrożnego a zarazem prawidłowego wnioskowania. W pracy znalazło się kilka drobnych błędów redakcyjnych oraz interpunkcyjnych, które nie mają żadnego wpływu na jej wartość merytoryczną.

Podsumowując, uważam, że rozprawa doktorska mgr Dagmary Michałowskiej jest niezwykle cennym, samodzielnym opracowaniem naukowym o wysokim potencjale badawczym i wdrożeniowym, a tym samym spełnia wszelkie wymogi stawiane tego rodzaju opracowaniom, które zostały określone 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.). Wnoszę zatem do Wysokiej Rady Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu o dopuszczenie mgr Dagmary Michałowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego oraz stosowne wyróżnienie pracy.

Michał Nowicki

Prof. dr hab. n. med. Michał Nowicki