



**UNIwersYTET MEDYCZNY**  
IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH WE WROCLAWIU

Prof. dr hab. Andrzej Szuba

Katedra i Klinika Angiologii, Nadciśnienia Tętniczego i Diabetologii

Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu

Ul. Borowska 213; 50-556 Wrocław

Wrocław 10.05.2020

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

**Szymona Czauderny**

pt.: Wpływ polimorfizmu genu apolipoproteiny E na procesy regeneracyjne

**Wybór tematu**

Rany a zwłaszcza rany przewlekłe są ważnym problemem zdrowotnym zarówno dla chorych i leczących ich lekarzy, jak i dla zdrowia publicznego. W Polsce ocenia się, że około 1% społeczeństwa cierpi z powodu przewlekłych owrzodzeń podudzi, a w 2014, jak wynika z map potrzeb zdrowotnych, przewlekłe owrzodzenia były przyczyną około 15 tysięcy hospitalizacji. Patofizjologia gojenia się ran jest jeszcze słabo poznana, dlatego badania podstawowe nad procesami gojenia się ran są niezwykle ważne.

Doktorant w swoich badaniach skoncentrował się nad wpływem polimorfizmu genu apolipoproteiny E na procesy regeneracyjne.

Apolipoproteina E odgrywa istotną rolę w procesie gojenia się ran. Myszy pozbawione apolipoproteiny E mają upośledzone procesy gojenia ran. Apolipoproteina E ma trzy odmiany polimorficzne z różnym powinowactwem do receptora APOE, które z różną częstością występują u ludzi. Polimorfizm APOE jest powiązany między innymi z zaburzeniami gospodarki lipidowej i ryzykiem choroby wieńcowej.

We wstępie do pracy doktorskiej doktorant szeroko omawia proces gojenia ran, w tym rolę miRNA w gojeniu ran. W dalszej części charakteryzuje apolipoproteinę E, polimorfizm APOE i jego konsekwencje. Ponadto charakteryzuje wpływ APOE na regulację stanu zapalnego przez miRNA.

Wstępna część rozprawy doktorskiej i cytowana w niej literatura (łącznie 122 pozycje), wskazują na bardzo dobrą znajomość tematu i swobodę poruszania się w jego obrębie przez doktoranta.

## **Cel pracy**

Celem przeprowadzonych przez doktoranta badań było wyjaśnienie znaczenia polimorfizmu APOE w procesie gojenia się ran oraz procesów angiogenezy i arteriogenezy w modelu niedokrwienia kończyny na modelu zwierzęcym u myszy transgenicznym typu knock-in z ludzkimi genami APOE3 i APOE4 oraz zbadanie wpływu izoform APOE3 i APOE4 na kontrolę ekspresji miRNA i innych czynników uczestniczących w procesie gojenia ran z użyciem linii monocytarno-makrofagowej RAW264.7 z ekspresją APOE3 i APOE4.

Problem ran przewlekłych i ich upośledzonego gojenia się zarówno u chorych z przewlekłą niewydolnością żylną jak i chorych z owrzodzeniami niedokrwienymi jest bardzo istotnym problemem zdrowotnym, przyczyną niepełnosprawności i znacznych kosztów dla systemów opieki zdrowotnej. Badania nad patofizjologią procesów gojenia są niezwykle istotne dla opracowania skutecznych metod leczenia. Dlatego uważam cel rozprawy za dobrze dobrany, a wybór tematu aktualny.

## Metody

Autor zaplanował i wykonał szereg eksperymentów na liniach komórkowych oraz zwierzętach laboratoryjnych: myszach typu dzikiego oraz myszach *knock-in*, u których gen ApoE został zastąpiony cDNA ludzkich odpowiedników - APOE3 i APOE4. Myszy hodowano w zwierzętarni WBBiB, a uzyskane homozygotyczne samce APOE<sup>3/3</sup> i APOE<sup>4/4</sup> użyto do eksperymentów badawczych.

Na wszystkie doświadczenia autor uzyskał zgodę Lokalnej Komisji Etycznej.

W celu oceny tempa gojenia się ran po usunięcia owłosienia grzbietu myszy wycinał skórę grzbietu sztancą biopsyjną i oceniał tempo gojenia się ran mierząc codziennie pole powierzchni ran, aż do ich wygojenia. W ostatnim dniu obserwacji doktorant pobierał wycinki skóry z brzegu rany do dalszych badań: immunohistochemicznych oraz oznaczania poziomu VEGFA w skórze.

W celu oceny wpływu polimorfizmu APOE na angio i arteriogenezę autor podwiązywał tętnicę głęboką uda kończyny tylnej myszy a następnie oceniał przepływ skórny na podszwach stóp za pomocą przepływomierza laserowego. Pomiary wykonywał wielokrotnie od pierwszego do 28 dnia po zabiegu.

W badaniach doktorant wykorzystywał między innymi profilowanie miRNA z zastosowaniem zaawansowanej analizy bioinformatycznej przy użyciu Ingenuity Pathway Analysis, aktywowane fluorescencyjnie sortowanie komórek (FACS), badania immunohistochemiczne, testy immunoenzymatyczne oraz analizę ilościową ekspresji wybranych genów metodą qPCR.

Zaplanowany i przeprowadzony eksperyment oraz szeroki zakres wykonanych badań świadczą o bardzo dobrym opanowaniu metod badawczych przez doktoranta.

Metodyka przeprowadzonych badań, jak również analiza statystyczna uzyskanych wyników nie budzą zastrzeżeń.

## Rezultaty i Dyskusja

Opis otrzymanych rezultatów badań zawarto na 32 stronach maszynopisu oraz 29 rycinach starannie opracowanych wykresach i rycinach. Dyskusja otrzymanych rezultatów obejmuje kolejnych 10 stron pracy. Autor przeprowadził nowoczesne, pracochłonne i różnorodne badania, zgromadził dużą ilość wyników i umiejętnie je zinterpretował.

Do najważniejszych wyników pracy zaliczam wykazanie wpływu polimorfizmu APOE na profile ekspresji miRNA, w tym na ścieżki sygnałowe kontrolujące migrację komórek, co doktorant potwierdził potwierdzając różnice w tempie migracji komórek APOE4+ i APOE3+.

Pomimo wykazania braku wpływu polimorfizmu APOE na tempo gojenia się ran i arterio oraz angiogenezy, uważam że wyniki uzyskanych przez autora badań mają istotne znaczenie zarówno naukowe jak i kliniczne oraz stanowią ważny krok w kierunku zrozumienia mechanizmów gojenia się ran i angiogenezy.

Praca spełnia całkowicie wymagania stawiane rozprawom doktorskim. Oceniam ją dobrze i dlatego proszę Wysoką Radę Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie o dopuszczenie do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Andrzej Szuba