



Szczecin 12.12.2022r.

Prof. dr n.med. Małgorzata Milkiewicz
Zakład Biologii Medycznej
Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr **Aleksandry Kopacz** zatytułowanej

“The novel mechanisms of the regulation of the endothelial cell functions and aortic pathology – focus on NRF2/KEAP1 axis and microRNA-34a”

Według danych statystycznych Światowej Organizacji Zdrowia, choroby układu krążenia takie jak nadciśnienie, miażdżyca tętnic, choroba niedokrwienna serca, czy tętniaki stanowią podstawową przyczyną śmierci około 18 milionów ludzi rocznie. Przyczyny tych chorób mogą być różne; jednak większość z nich ma jedną wspólną cechę, jest nią stres oksydacyjny, który jest wynikiem braku równowagi między produkcją a detoksykacją reaktywnych form tlenu. NrF2 jest wielofunkcyjnym czynnikiem transkrypcyjnym, który kontroluje podstawową i indukowaną ekspresję wielu genów zaangażowanych w obronę antyoksydacyjną oraz regulację stanu zapalnego. Białko to również utrzymuje zdrowy fenotyp komórek śródbłonna naczyń krwionośnych. Dotychczasową wiedzę na temat roli śródbłonna w patogenezie tętniaka aorty brzusznej należy uznać za niepełną. Komórki śródbłonna z uwagi na swoją określoną lokalizację są stale narażone na stres mechaniczny lub chemiczny, który może zaburzać ich funkcjonowanie. Natomiast, patologiczne poszerzenie średnicy aorty jakie obserwujemy w tętniaku aorty brzusznej, dramatycznie zwiększa ryzyko nagłego krwotoku, a nawet śmierci. Dlatego temat podjętych badań przez doktorantkę Panią mgr Kopacz – jakim jest scharakteryzowanie mechanizmów odpowiedzialnych za starzenie się i dysfunkcję komórek śródbłonna leżących u podstaw powstawania tętniaka aorty brzusznej, jest bardzo ważny zarówno z poznawczego jak i aplikacyjnego punktu widzenia.

Realizacja zaplanowanych badań była możliwa dzięki przeprowadzeniu dobrze zaprojektowanych i wymagających dużej sprawności technicznej analiz. Doktorantka próbując udowodnić hipotezy wykorzystywała trzy modele doświadczalne: *in vivo*, *ex vivo* i *in vivo*. W modelach *in vivo* i *ex vivo* eksperymenty przeprowadzono przy użyciu myszy z nokautem transkrypcyjnym genu NRF2, lub śródbłonkowo-specyficznym nokautem miRNA-34a, a tętniak aorty brzusznej zaindukowano infuzją

angiotensyny II. Natomiast do badań *in vitro* wykorzystano ludzkie komórki śródbłonna aorty. Zastosowana w pracy metodyka jest bardzo rozbudowana, analizy zostały wykonane przy zastosowaniu wielu bardzo zaawansowanych technik biologii molekularnej, a doświadczenia zostały przeprowadzone w sposób pozwalający na uzyskanie wiarygodnych wyników.

Doktorantka wykazała, że niedobór transkrypcji NRF2 prowadzi do przedwczesnego starzenia się aorty, które podobnie jak starzenie fizjologiczne charakteryzuje się nasilonym naciekiem przez komórki układu odpornościowego oraz anomaliami strukturalnymi w obrębie warstwy wewnętrznej aorty polegającymi na nadmiernym unaczynieniu aorty czy otaczającej ją tkanki tłuszczowej. Zastosowanie symwastatyny zmniejsza zarówno patologiczne unaczynienie jak i przepuszczalność śródbłonna. Pani mgr Kopacz udowodniła, że w komórkach śródbłonna wyciszenie genu NRF2 prowadzi do przedwczesnego starzenia, któremu towarzyszy indukcja ekspresji miRNA-34a-5p. Nadekspresję miRNA-34a-5p doktorantka zaobserwowała również w odpowiedzi na podanie angiotensyny II. W dalszej części pracy doktorantka wykazała, że zahamowanie ekspresji miRNA-34a w komórkach endotelialnych prowadzi do istotnego zmniejszenia grubości warstwy glikokaliksu przy jednoczesnym wzroście sztywności ściany tętnicy, a w konsekwencji do pogorszenia funkcji śródbłonna oraz obniżenia produkcji tlenu azotu. Ciekawym spostrzeżeniem doktorantki jest obserwacja, że usunięcie miRNA-34a ze śródbłonna aorty myszy z nokautem transkrypcyjnym NRF2 efektywnie chroni przed rozwojem tętniaka indukowanego angiotensyną II, i jest to zależne od proliferacji komórek endotelialnych. Podsumowując wyniki swojej pracy doktorantka konstatuje, że związane z wiekiem obniżenie proliferacji komórek może wywołać pojawienie się ubytków w warstwie błony wewnętrznej czego następstwem jest uszkodzenie tętnic oraz powstawanie tętniaka.

Rozprawa doktorska Pani mgr Aleksandry Kopacz licząca 169 stron maszynopisu napisana jest w języku angielskim i zawiera 93 ryciny oraz 11 tabel. Przytoczone odwołania literaturowe obejmują 453 pozycje i są adekwatne do podjętej tematyki i przedstawiają aktualny stan wiedzy w tym zakresie. Praca przygotowana jest w sposób klasyczny i obejmuje: *Wstęp, Cel, Materiał i Metody, Wyniki, Dyskusję* oraz wyodrębnione w osobny rozdział *Wnioski*. Całość poprzedzona jest polskim i angielskim *Streszczeniem, Spisem Treści* oraz *Wykazem Stosowanych Skrótów*, a zakończona *Piśmiennictwem, Spisem publikacji naukowych doktorantki* oraz rozdziałem zatytułowanym *Dodatkowe Informacje*, który zawiera 15 uzupełniających figur. Zarówno kompozycja jak i zawartość poszczególnych części jest prawidłowa.

Wstęp, to rozdział, w którym doktorantka szczegółowo wprowadza czytelnika w zagadnienia dotyczące sił biomechanicznych odgrywających istotną rolę w układzie tętniczym. Kolejną część wstępu to prezentacja śródbłonna jako niezbędnego koordynatora prawidłowego funkcjonowania układu krwionośnego oraz opis doniesień literaturowych na temat patogenezy tętniaka aorty. Rozdział ten jest zakończony spójną charakterystyką molekularnych czynników, takich jak NRF-2, Keep1 i miR-34a, które są związane z modulacją procesu starzenia się komórek. Tekst jest bogato ilustrowany profesjonalnie przygotowanymi i czytelnymi schematami, które świetnie ilustrują kwestie opisywane przez doktorantkę i znacząco ułatwiają śledzenie

wątków wprowadzanych przez nią do prezentowanej pracy. Te jasne i logiczne opracowanie stanowi dodatkowy argument wyjaśniający celowość podjęcia badań będącym tematem pracy.

Zawarty w kolejnej części rozprawy rozdział *Cel pracy* stanowi konsekwencję zagadnień i hipotez zaprezentowanych we *Wstępie*. Wiedza literaturowa i wcześniejsze doświadczenia doktorantki pozwoliły na postawienie następujących założeń. Po pierwsze, przedwczesne starzenie się aorty charakteryzujące się znaczącymi zmianami strukturalnymi jest uwarunkowane ekspresją NRF2. Po drugie, predyspozycja do rozwój tętniaka wynika z podwyższonej ekspresji miRNA-34a w komórkach śródbłonka, tak więc zahamowanie jego ekspresji może przyczynić się do utrzymania zdrowego fenotypu śródbłonka i tym samym chronić przed rozwojem tętniaka aorty.

W części *Metody* szczegółowo zostały scharakteryzowane grupy badane i kontrolne, opisano pochodzenie materiału badanego, podano odpowiednie zgody komisji bioetycznej stanowiące podstawę prowadzenia badań, a także przedstawiano metodykę licznych eksperymentów zastosowanych w różnych modelach badawczych zarówno *in vivo*, *ex vivo* oraz *in vitro*. Doktorantka wykorzystuje nowoczesny warsztat aparaturowy oraz szeroki wachlarz umiejętności badawczych takich jak kaniulacja tętnicy i mierzenie ciśnienia krwi u zwierząt doświadczalnych, ultrasonograficzne obrazowanie aorty brzusznej, przyżyciowa obserwacja adhezji leukocytów, ocena mikrokrążenia, immunohistochemia na parafinowych i mrożonych skrawkach, badanie aktywności SA- β -gal, barwienie fluorescencyjne *en face*, zymografia i hybrydyzacja *in situ*, izolacja RNA i miRNA oraz PCR w czasie rzeczywistym. Co z całą pewnością potwierdza nabycie odpowiednich kompetencji do prowadzenia samodzielnych badań naukowych. Będąc pod wrażeniem ilości metod badawczych zastosowanych w projekcie zastanawia mnie czy wszystkie były wykonywane osobiście przez doktorantkę. W opisie metod znalazłam tylko jedną wzmiankę o współpracy z zespołem z Jagiellonian Center for Experimental Therapeutics, natomiast w podpisach pod figurami gdy wykorzystywano mikroskopię sił atomowych wspomniany jest instytut Fizyki z UJ, a prezentując wyniki spektrometrii masowej odnotowano współpracę z Instytutem Biochemii i Biofizyki PAN.

Rozdział prezentujący wyniki zasługuje na uznanie nie tylko z powodów merytorycznych, ale także graficznych. Rozdział zawiera liczne, w pełni informatywne wykresy oraz ryciny obrazujące uzyskane wyniki.

Dyskusja została opracowana niezwykle szczegółowo i wnikliwie, tak aby czytelnik nie miał wątpliwości co do zasadności formułowanych wniosków. Doktorantka przedstawiła zebrane wyniki swojej pracy i zaprezentowała je na tle badań innych ośrodków zajmujących się podobną problematyką badawczą. W moim odczuciu szkoda tylko, że doktorantka nie uwzględniła doniesień o innych cząsteczkach mikroRNA, które zostały opisane w kontekście tworzenia tętniaka aorty brzusznej, na przykład prace dotyczące roli miR-21 czy miR-24 (Maegdefessel et al. 2012, 2014)

Wypełniając obowiązki recenzenta jestem zmuszona nadmienić, że autorka nie ustrzegła się kilku błędów edytorskich czy stylistycznych, jednakże wymienione poniżej niedociągnięcia w żadnym stopniu nie obniżają wartości merytorycznej niniejszej rozprawy.

1. *Table of contents*: brak numeracji rozdziałów i podrozdziałów

2. *Table of contents*: brak spisu rycin i tabel
3. *Table of contents*: w rozdziale *Materials and Methods* podział na 3 modele badań bez wymieniania poszczególnych podrozdziałów opisujących zastosowane metody jest nieczytelny i mało informatywny
4. *Table of contents*: brak rozdziału *Discussion*
5. *Table of contents*: dla lepszej czytelności tytułów podrozdziałów użyłabym pełnej nazwy „endothelial cells “ i „abdominal aortic aneurysm” zamiast zamieszczonych w tekście skrótów: EC czy AAA. Zauważyłam również, że skrót AAA nie jest uwzględniony w spisie skrótów.
6. na stronie 7 w zdaniu kończącym przedostatni akapit powinno być chroni „przed” TAB, a nie „przez”
7. strona 72: w części *Statistical Analysis* podana jest informacja, że dane prezentowane są jako mean ± SEM jednak na figurach zaprezentowano je jako wykresy punktowe z danymi indywidualnymi z mean ale bez SEM.
8. strona 82: w opisie figury brakuje informacji czego dotyczy oznaczenie: no/yes. Podobnie co oznaczają podane na wykresie procenty (15 % czy 25%)?
9. strona 83: w opisie figury R11B brak informacji odnoszącej się do oznaczenia Ang II i AAA. Czy oznaczenie to odzwierciedla eksperyment prezentowany na fig R11A: Ang II (no AAA) i Ang II (AAA)?
10. strona 122: ostatnie zdanie brak rozwinięcia skrótu NNT, bark go również na spisie skrótów

Podsumowując, przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska Pani mgr Aleksandry Kopacz spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018 poz.1668 z późn. zmianami) i wnioskuję do Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie o dopuszczenie mgr Aleksandry Kopacz do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie biorąc pod uwagę bardzo wysokie walory merytoryczne przedstawionej rozprawy doktorskiej oraz fakt, że wyniki prac badawczych zostały już opublikowane czasopismach anglojęzycznych, z pierwszym autorstwem doktorantki wnioskuję o wyróżnienie niniejszej pracy doktorskiej.

Krzysztofa Millienica