



Warszawa 28.11.2022

Prof. dr hab. Paweł Dobrzyń
Kierownik Pracowni Molekularnej Biochemii Medycznej
Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego, PAN
ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa

Ocena rozprawy doktorskiej mgr Aleksandry Kopacz

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

Według definicji medycznych tętniak jest poszerzeniem światła tętnicy o co najmniej 50% w porównaniu z niezmiennym odcinkiem naczynia i powstaje w wyniku zmian patologicznych zachodzących w ścianie tętnicy. Ściana tętniaka jest w porównaniu ze ścianą zdrowego naczynia słabsza, zmieniona pod względem morfologicznym, histologicznym, mechanicznym i w związku z tym łatwiej ulega pęknięciu. Tętniak aorty brzusznej dotyczy jednej z największych arterii odprowadzającej krew z serca. Tętniaki aorty brzusznej są obecne u około 4,5 % populacji ludzi po 40 roku życia, przy czym znacznie częściej zdarzają się one u mężczyzn niż u kobiet. Oprócz niezbadanych do końca czynników genetycznych, wyróżnia się też inne przyczyny powstawania tej choroby. Do najczęściej wymienianych należą zwyrodnienia i osłabienia warstwy środkowej ściany tętnic, które powstają jako skutek utrzymywania się przewlekłego nadciśnienia oraz podniesionego poziomu cholesterolu we krwi. Jednak molekularne mechanizmy powstawania tętniaków nie są do końca poznane, a rola komórek śródbłonna w tym procesie była dotychczas prawie całkowicie pominięta.

Praca doktorska mgr Aleksandry Kopacz zrealizowana została w Zakładzie Biotechnologii Medycznej, Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii UJ pod kierunkiem dr hab. Anny Grochot-Przęczek. Maszynopis został przygotowany w języku angielskim i zawiera 169 stron. Rozprawa ma klasyczny układ dla tego typu dysertacji i jest podzielona na następujące rozdziały: 1) List of abbreviations (3 strony), 2) Introduction (39 stron), 3) Aim (1 strona), 4) Materials and Methods (20 stron), 5) Results (43 strony), 6) Discussion (20 stron), 7) Conclusions (1 strona),



8) References (23 strony). Całość poprzedzają streszczenia w języku angielskim i polskim, a kończy przedstawienie dotychczasowych osiągnięć naukowych Doktorantki oraz materiały dodatkowe.

Rozdział Wstęp zawiera interesujące informacje, które wprowadzają czytelników w tematykę badań zaprezentowaną w dalszej części dysertacji. Rozdział ten, tak jak i cała praca, jest napisany klarownym językiem. Ułatwieniem w przyswajaniu zawartych w tym rozdziale informacji są zamieszczone w nim liczne ryciny oraz tabele. W części tej Doktorantka przedstawiła informacje m.in. o biomechanicznych właściwościach naczyń krwionośnych, o przyczynach powstawania tętniaków aorty, roli śródbłonka w regulacji funkcjonowania naczyń krwionośnych, funkcji białek NRF2 i KEAP1 jako regulatorów działania układu sercowo-naczyniowego i starzenia się komórek oraz roli mikroRNA-34a w regulacji fizjologii komórek. Rozdział ten, jak i cała praca, został przygotowany bardzo starannie pod względem edycyjnym. Jedynym drobnym niedociągnięciem jest umieszczenie tytułów u dołu tabel, a nie u góry (jak to się zwykle stosuje).

Celem przeprowadzonych badań było określenie mechanizmów starzenia się i dysfunkcji komórek śródbłonka leżących u podstaw rozwoju chorób układu sercowo-naczyniowego, głównie tętniaka aorty brzusznej. Główny nacisk położono na: 1) określenie roli czynnika NRF2 w przedwczesnym starzeniu się komórek śródbłonka i predyspozycji do powstawania tętniaków, 2) analizę wzajemnego oddziaływania pomiędzy NRF2 oraz mikroRNA-34a w procesie powstawania tętniaków, 3) weryfikację hipotezy, że obniżenie poziomu mikroRNA-34a w komórkach śródbłonka wpływa na utrzymanie ich zdrowego fenotypu i zapobiega powstawaniu tętniaków aorty. W wykonanych badaniach użyto unikalne modele in vivo, takie jak: 1) myszy z nokautem genu NRF2 z indukowalnym nokautem mikroRNA-34a w komórkach śródbłonka, 2) myszy z nokautem mikroRNA-34a w komórkach śródbłonka, 3) transgeniczne myszy ROSA-Rainbow umożliwiające śledzenie losów komórek śródbłonka. U myszy tych eksperymentalnie wywoływano powstanie tętniaka aorty brzusznej oraz zakrzepicę. Następnie wykonano szereg badań in vivo takich jak: pomiar ciśnienia krwi, badanie ultrasonograficzne aorty brzusznej, przyżyciowa ocena przylegania leukocytów, analiza prędkości fali tętna. W badaniach wykorzystano też różne techniki mikroskopowe, zymografię, analizę ekspresji genów za pomocą real time PCR, elektronowy rezonans paramagnetyczny, analizę proteomiczną oraz zawartości cholesterolu przy użyciu spektrometrii mas, pomiar zdolności angiogennej eksplantatów aorty. Poza tym, w analizach użyto ludzkie komórki śródbłonka aorty (HAECs), w których wyciszono ekspresję NFE2L2, TP53, PDGFRA, PDGFRB oraz mikroRNA-34a-5p. Tutaj mam drobna uwagę, mianowicie przy prezentowaniu rezultatów osiągniętych z użyciem tego modelu z pewnością warto byłoby przedstawić dane prezentujące wydajność tych transfekcji. Należy podkreślić natomiast, że szeroki zakres użytych technik



potwierdza bardzo duży potencjał naukowy Doktorantki, a cała metodyka użyta w badaniach została szczegółowo opisana w rozprawie.

Wyniki uzyskane w trakcie realizacji badań zaprezentowano w formie 40 czytelnych rycin oraz 1 tabeli. Dodatkowo 15 rycin prezentujących także uzyskane przez doktorantkę rezultaty zamieszczono jako suplement na końcu rozprawy. Przeprowadzone analizy wykazały m.in., że: 1) wyciszenie ekspresji NRF2 jest powiązane z wcześniejszym starzeniem się i zmianami strukturalnymi w naczyniach krwionośnych. Predysponuje to do powstawania tętniaków aorty, a proces ten może być spowolniony przez działanie statyn; 2) mikroRNA-34a jest istotnym czynnikiem regulującym funkcje śródbłonna, a podatność myszy z nokautem NRF2 na powstawanie tętniaków aorty brzusznej jest powiązana ze zwiększoną ilością mikro-34a w komórkach śródbłonna; 3) obniżenie ekspresji mikroRNA-34a u myszy z nokautem NRF2 w komórkach śródbłonna zapobiega tworzeniu się tętniaków aorty wywołanych działaniem angiotensyny II; 4) zwiększona proliferacja komórek śródbłonna chroni przed powstawaniem tętniaka aorty, a w przypadku jego powstania stabilizuje go; 5) zmiany strukturalne w obrębie warstwy wewnętrznej aorty korelują z częstością występowania tętniaków, co jest powiązane z nadmiernym unaczynieniem aorty oraz otaczającej jej okołonaczyniowej tkanki tłuszczowej. Wszystkie dane eksperymentalne przedstawione w rozdziale 'Wyniki' należy uznać za bardzo interesujące i nowatorskie. Pewien niedosyt pozostawia jedynie brak analizy ilościowej wyników powiązanych z analizami mikroskopowymi. Np. podpisy do rycin R7 czy też R21 wskazują, że obserwowane różnice są istotne, a to mogłaby pokazać jedynie wykonana analiza statystyczna, do przeprowadzenia której niezbędne są dane liczbowe. Podobnie rycina R8, której podpis wskazuje na podwyższoną aktywność MMP-9 w tętniaku. Oczywiście ta drobna uwaga nie ma wpływu na moją bardzo wysoką ocenę recenzowanej rozprawy.

Otrzymane przez mgr Kopacz oryginalne wyniki eksperymentalne zostały omówione w odniesieniu do dostępnego stanu wiedzy w rozdziale 'Dyskusja'. Doktorantka solidnie i krytycznie odniosła się do uzyskanych rezultatów, a całość została podsumowana czterema rycinami. Dyskusja dowodzi, że mgr Kopacz z łatwością porusza się w trudnych zagadnieniach związanych z funkcjonowaniem układu sercowo-naczyniowego. Podobnie jak całość pracy rozdział ten czyta się bardzo dobrze. Podkreślić chciałbym także fakt umieszczenia w spisie cytowanych publikacji aż 453 pozycji, z których większość została opublikowana w ostatnich latach. Całość dysertacji kończy 9 wniosków szczegółowych oraz podsumowujący całość wniosek końcowy.

Niezależnie od mojej bardzo wysokiej oceny dysertacji, czuję się w obowiązku przedstawić kilka uwag i pytań, które nasunęły mi się po jej wnikliwym przestudiowaniu:



1. Czy przeprowadzona stymulacja angiotensyną II oraz transfekcja komórek poszczególnymi sekwencjami siRNA miały wpływ na żywotność komórek HAEC?
2. Przeprowadzone badania wykazały związane z powstawaniem tętniaków zmiany w unaczynieniu okołonaczyniowej tkanki tłuszczowej. Czy wiadomo coś o zmianach w funkcji wydzielniczej okołonaczyniowej tkanki tłuszczowej w analizowanych modelach badawczych oraz i ich ewentualnym wpływie na powstawanie tętniaków?
3. Czy uzyskane przez doktorantkę rezultaty mogą mieć potencjalne znaczenie praktyczne? Czy znane są terapie ukierunkowane na modulowanie czynników NRF2 oraz mikroRNA-34a w stanach patologicznych?

Proszę aby w czasie obrony Doktorantka przedstawiła odpowiedzi na powyższe zagadnienia.

Wniosek końcowy

Pracę doktorską **mgr Aleksandry Kopacz pt. *The novel mechanisms of the regulation of the endothelial cell functions and aortic pathology – focus on NRF2/KEAP1 axis and microRNA-34a*** oceniam bardzo pozytywnie. Rozprawa ta zawiera wyniki oryginalnych badań i stanowi istotny wkład w poznanie mechanizmów powstawania tętniaków aorty brzusznej, ze szczególnym uwzględnieniem czynników NRF2 oraz mikroRNA-34a w tym procesie. Część wyników wchodzących w skład rozprawy już została zaprezentowana w dwóch pracach opublikowanych w świetnych czasopismach w dziedzinie. Pozostałe rezultaty zapewne także ukażą się w bardzo dobrych czasopismach o zasięgu międzynarodowym. Podsumowując stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr Kopacz spełnia warunki określone w artykule 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1668 z późn.zm). Zwracam się zatem do Rady Dyscypliny Nauki biologiczne Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie o dopuszczenie mgr Aleksandry Kopacz do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora. Równocześnie, biorąc pod uwagę wysoki poziom naukowy przeprowadzonych badań oraz ich nowatorski charakter, wnioskuję o wyróżnienie tej rozprawy odpowiednią nagrodą.

Renet Dobryn'