



UNIWERSYTET RZESZOWSKI  
ZAKŁAD HISTOLOGII I EMBRIOLOGII  
ul. Leszka Czarnego 4, 35-615 Rzeszów  
tel. 178518900, e-mail: knm@ur.edu.pl

Recenzja  
Podzikan  
Wydziału Lekarskiego  
ds. Nauki  
M. Pawłowska  
prof. dr hab. Małgorzata Pawłowska

dr hab. Agata Wawrzyniak prof. UR  
Zakład Histologii i Embriologii  
Instytut Nauk Medycznych  
Kolegium Nauk Medycznych UR

Rzeszów, 16.06.2023.

### Recenzja

#### **Rozprawy doktorskiej Pani mgr Wioletty Zielińskiej pt.: „Rola kanału wapniowego TRPM2 w odpowiedzi komórek śródbłonka naczyniowego na warunki stresu oksydacyjnego”.**

Pani mgr Wioletta Zielińska wykonała pracę w Katedrze Histologii i Embriologii, Wydziału Lekarskiego, Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu”, pod kierunkiem Pana dr hab. n. med. Macieja Gagata, prof. UMK. Należy podkreślić imponujący dorobek naukowy Doktorantki, który obejmuje łączną wartość punktacji KBN/MEiN: 2546.000, wartość wskaźnika IF: 83.368; cytowania (Web of Science): 205; Index H (Web of Science): 8; cytowania (Scopus): 217; Index H (Scopus): 8.

Przedstawiona mi do recenzji praca jest interesująca i ważna, ponieważ zgodnie z obecnym stanem wiedzy są to pierwsze badania mające na celu ocenę znaczenia kanału wapniowego TRPM2 w kontekście odpowiedzi modelowych komórek śródbłonka na warunki indukowanego stresu oksydacyjnego. Stres oksydacyjny powstaje, gdy w komórkach dochodzi do nagromadzenia wolnych rodników, z którymi mechanizmy obronne organizmu nie są w stanie sobie poradzić. Długotrwałe utrzymujący się stres oksydacyjny może uszkadzać komórki, białka i DNA, co skutkuje rozwojem wielu chorób. Przewaga wolnych rodników nad przeciwutleniaczami jest wynikiem zwiększonej produkcji reaktywnych form tlenu lub zmniejszonej obrony antyoksydacyjnej. Doktorantka dokonała również oceny możliwości potencjalnego wykorzystania inhibitorów TRPM2 i PARP w prewencji oraz terapii chorób układu krążenia związanych z dysfunkcją śródbłonka.

Układ pracy jest typowy dla rozpraw doktorskich, zawiera wstęp, cel pracy, dane o materiale i metodyce badań, omówienie wyników, dyskusję oraz wnioski. Rozpoczyna ją obszerny wstęp literaturowy liczący 29 stron, w którym Autorka podsumowała dotychczasową wiedzę i w czytelny sposób zaprezentowała charakterystykę śródbłonka oraz

funkcjonowanie specyficznej bariery śródbłonkowej, która jest jednym z ważnych aspektów zachowania homeostazy układu sercowo-naczyniowego. Następnie przybliżyła opis jednego z błonowych kanałów wapniowych (TRPM2), którego aktywacja występuje w przebiegu stresu oksydacyjnego. Rozdziały te stanowią idealne wprowadzenie czytelnika do badań własnych Doktorantki. W prezentowanym rozdziale Autorka wykazała doskonałą znajomość aktualnej wiedzy dotyczącej tematu pracy, a analiza bieżącego piśmiennictwa stanowi solidne i przejrzyste przedstawienie zagadnień związanych z tematem dysertacji.

Przedstawione po wstępie cele zostały jasno sformułowane. W kolejnych rozdziałach Doktorantka w sposób szczegółowy i nie budzący żadnych zastrzeżeń przedstawiła materiał, metodykę oraz osiągnięte wyniki. Wykorzystany w badaniach materiał posłużył do wyjaśnienia znaczenia działania kanału wapniowego TRPM2 i odpowiedzi komórek śródbłonka na warunki stresu oksydacyjnego. Doktorantka posłużyła się różnorodnymi metodami badawczymi. W celu indukcji stresu oksydacyjnego komórki hodowano w obecności nadtlenu wodoru. W celu manipulacji poziomem ekspresji TRPM2 wykorzystano technikę elektroporacji metodą nukleofekcji. Różnice w odpowiedzi komórek na działanie nadtlenu wodoru wobec ekspresji TRPM2 badano w zakresie: ich żywotności, rodzaju indukowanej śmierci, wewnątrzkomórkowego poziomu jonów  $Ca^{2+}$ , zdolności migracyjnych, poziomu i lokalizacji białek połączeniowych oraz organizacji cytoszkieletu. Wykonano test migracji wobec środowiska chemoatrakcyjnego, a w celu oceny potencjału migracyjnego komórek linii EA.hy926, zastosowano test „gojenia się ran”. W niniejszej rozprawie wykorzystano również metodę immunofluorescencyjnego znakowania białek oraz potranslacyjną ocenę ich ekspresji z zastosowaniem metody Western Blot. Zrealizowanie, a następnie opracowanie tak dużej liczby analiz należało do przedsięwzięć bardzo pracochłonnych, wymagających ogromnie cierpliwości, wytrwałości, a przede wszystkim bardzo dobrego przygotowania i znajomości badanej problematyki. Dzięki zastosowaniu odpowiednio dobranych technik badawczych, Doktorantka wykazała, że stres oksydacyjny imitowany w komórkach linii EA.hy926 poprzez traktowanie ich nadtlentem wodoru prowadzi do zmian charakterystycznych dla dysfunkcji śródbłonka. Ograniczenie poziomu kanału TRPM2 poprzez transfekcję komórek siRNA przeciwko TRPM2 oraz zmniejszenie aktywności kanału z wykorzystaniem inhibitorów TRPM2 lub PARP wykazały działanie protekcyjne względem komórek śródbłonka linii EA.hy926, traktowanych nadtlentem wodoru. Zastosowane metody badawcze pozwoliły wysnuć przypuszczenie, że błonowy kanał



Doktorantka nie ustrzegła się drobnych błędów.

Doktorantka używa zamiennie „jony  $Ca^{2+}$ ”, albo tylko „ $Ca^{2+}$ ”. Należałoby wszędzie stosować określenie jony  $Ca^{2+}$  (strony: 10, 11, 23, 24, 25, 30, 47, 62, 107, 110, 111, 113, 115);

Strona 10 – „którego funkcję pełni siateczka śródplazmatyczna”- należałoby uściślić siateczka śródplazmatyczna gładka, ponieważ określenie siateczka śródplazmatyczna dotyczy zarówno siateczki o błonach szorstkich jak i gładkich;

Doktorantka stosuje oznaczenia i ; ii; iii; iv; v – Lepiej byłoby zastąpić to numeracją rzymską – odpowiednio: I; II; III; IV; V (strony: 11; 12; 16; 20; 32; 41;112);

Strona 12 – „śródbłonek naczyniowy” - wystarczy napisać śródbłonek lub endothelium, ponieważ to sformułowanie odnosi się do naczyń;

Strona 12 – „Ta pojedyncza warstwa komórek wyściela cały układ krążenia” - lepiej byłoby zastąpić wyściela błonę wewnętrzną (lub *tunica intima*) w naczyniach krwionośnych i limfatycznych, ponieważ nie tylko śródbłonek buduje cały układ krążenia;

Doktorantka stosuje określenie „miocytów gładkich”. Wystarczy miocytów, ponieważ to określenie dotyczy tylko mięśniówki gładkiej (strony: 16, 17, 18; 117);

Strona 25 „Jego ekspresja została potwierdzona w wielu tkankach, w tym w szpiku kostnym, śledzionie, płucach, sercu, wątrobie” - poprawniej byłoby napisać w narządach, ponieważ szpik kostny, śledziona, płuca, serce, wątroba to nie tkanki, te narządy są zbudowane z tkanek;

2x powtórzono „rycina 16” w podpisach 2 różnych rycin. W związku z tym na stronach: 80, 81, 82; 83,84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 100, 102, 103, 104, 105 należałoby zmienić ich numerację. Zdjęcia, schematy oraz wykresy są wykonane bardzo profesjonalnie, dlatego należałoby je rozdzielić i inaczej podpisać. Schematy np. schemat, wykres np. wykres, a do zdjęć np. fotografia lub rycina;

Strona 109 – Doktorantka użyła określenia „siateczka śródplazmatyczna” – wcześniej używany był już skrót ER;

Strona 109 – (stylistyka) Dwa zdania: „Wprawdzie VE-kadheryna jest markerem charakterystycznym dla komórek śródbłonna. Jednakże, ekspresję tego białka potwierdzono również w komórkach nowotworowych zdolnych do mimikry naczyniowej” - można zastąpić jednym: „Wprawdzie VE-kadheryna jest markerem charakterystycznym dla komórek śródbłonna, jednakże ekspresję tego białka potwierdzono również w komórkach nowotworowych zdolnych do mimikry naczyniowej.”;

wapniowy TRPM2 może być traktowany jako potencjalny cel terapeutyczny w prewencji i terapii chorób układu sercowo-naczyniowego. Wykorzystane w badaniach inhibitory kanału TRPM2 (ACA i FFA) lub enzymu PARP (DPQ) dowiodły, że skutecznie hamują odpowiedź komórek linii EA.hy926 na działanie nadtlenu wodoru.

Dyskusja jest dobrze napisana, a Doktorantka niezwykle umiejętnie przeprowadziła argumentację otrzymanych wyników potwierdzając godną podziwu znajomość problematyki oraz świetną orientacją w temacie. Doktorantka w bardzo logiczny sposób dowodzi, funkcjonowanie bariery śródbłonkowej, a następnie tłumaczy znaczenie kanału wapniowego TRPM2 podkreślając potencjalne możliwości wykorzystania inhibitorów kanału TRPM2 lub enzymu PARP w prewencji i terapii chorób układu krążenia. Doktorantka przedstawiła wnioski końcowe wynikające z pracy, a uzyskane wyniki pozwoliły jej na sformułowanie 6 logicznych wniosków. Stanowią one meritum do stwierdzenia istotności znaczenia kanału wapniowego TRPM2 w kontekście jego funkcjonowania, odpowiedzi komórek endothelium na warunki stresu oksydacyjnego oraz podstawę do wykorzystania inhibitorów TRPM2 i PARP w profilaktyce i terapii chorób układu sercowo-naczyniowego.

Rozprawa doktorska Pani mgr Wioletty Zielińskiej ma formę wydruku komputerowego, liczy 148 stron, układ pracy jest logiczny i przejrzysty. Napisana jest poprawnym językiem polskim, a układ pracy jest typowy dla rozpraw doktorskich. Dysertację rozpoczyna czytelny spis treści, po którym znajduje się wykaz skrótów, wstęp, cel pracy, dane o materiale i metodyce badań, omówienie wyników, dyskusję, wnioski, streszczenie w języku polskim i angielskim oraz piśmiennictwo. Dołączona została również zgoda Komisji Bioetycznej. Wyniki zostały opracowane z bardzo dużą starannością oraz dokładnością. Są one zaprezentowane w sposób przejrzysty, przez co bardzo usprawnia to ich analizę. Opisy wyników są zrozumiałe i przystępne, a całość napisana jest poprawnym językiem, bez nadużywania zwrotów anglojęzycznych. Na podkreślenie zasługuje świetna szata graficzna, bardzo dobrej jakości fotografie (17), tabele (7), schematy (4) oraz wykresy (14), które ułatwiają ich zrozumienie i przeanalizowanie. Bogate piśmiennictwo jest aktualne, a Doktorantka umiejętnie je cytowała i krytycznie dobrała do wiedzy teoretycznej dotyczącej omawianych zagadnień. Piśmiennictwo zawiera 187 pozycji literatury w języku angielskim w tym co należy podkreślić 115 pozycji obejmuje okres ostatnich 10 lat.



Strona 109 (stylistyka) „jej translokacja pomiędzy regionem połączeniowym a cytoplazmą” – przed a powinien być przecinek;

Strona 112 (stylistyka) „w tworzenie połączeń międzykomórkowym” -w tworzeniu połączeń międzykomórkowych;

Strona 117 (stylistyka) „Potwierdza to wyniki badań” – potwierdzają to wyniki badań;

Strona 118 (stylistyka) „dziennie zmiany te zostały w istotny sposób” - te dzienne zmiany zostały w istotny sposób;

Strona 120 – „stres oksydacyjny oddziałujący ma komórki” –stres oksydacyjny oddziałujący na komórki;

Strona 135 - pozycja 23 - M F. Endothelium-Dependent Hyperpolarization and Endothelial Dysfunction. J. Cardiovasc. Pharmacol. maj 2016;67(5)

**M Félétou** Endothelium-Dependent Hyperpolarization and Endothelial Dysfunction. J. Cardiovasc. Pharmacol. maj 2016;67(5);

Strona 141 - pozycja 99 - Luo Y huan, Yu X fei, Ma C, Yang F, Yang W. Effects of calcium-binding sites in the S2–S3 loop on human and *Nematostella vectensis* TRPM2 channel gating processes. J Zhejiang Univ Sci B. 1 grudzień 2019;20(12):972–82.

Luo **Yu-H.**, Yu **Xia-F.**, Ma C, Yang F, Yang W Effects of calcium-binding sites in the S2–S3 loop on human and *Nematostella vectensis* TRPM2 channel gating processes. J Zhejiang Univ Sci B. 1 grudzień 2019;20(12):972–82;

Za wyjątkiem nielicznych błędów, niniejsza dysertacja została napisana poprawną polszczyzną, a przedstawione uwagi w żaden sposób nie umniejszają merytorycznej wartości rozprawy. Reasumując, przedstawiona do oceny rozprawa jest pracą bardzo wartościową. Należy podkreślić, że Doktorantka włożyła bardzo wiele wysiłku w jej wykonanie. Opisane w przedstawionej recenzji uchybienia w niczym nie umniejszają wartości merytorycznej prezentowanej pracy. Staranne omówienie wyników poparte bardzo szeroką bazą piśmiennictwa badań innych autorów, wskazuje na dojrzałość naukową Doktorantki. Doktorantka wykazała się umiejętnością samodzielnej pracy naukowej, przedstawiła w sposób zwięzły wyniki swoich bardzo szeroko zakrojonych badań i wysnuła logiczne wnioski. Pracę oceniam bardzo wysoko i **składam wnioski o jej wyróżnienie.**

**W podsumowaniu** chciałabym stwierdzić, że rozprawa doktorska Pani mgr Wioletty Zielińskiej spełnia warunki określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003r o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. z 2017r

poz.1789 oraz z 2016r poz. 1586 ze zm.). W związku z powyższym wnoszę do Rady Dyscypliny Nauki Medyczne Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu, o dopuszczenie Kandydatki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

*Agata Wawrzyniak*