



Recenzja rozprawy
Wioletty Zielińskiej
Prof. dr hab. Małgorzata Pawłowska

Prodziałan
Wydziału Lekarskiego
ds. Nauki

prof. dr hab. Małgorzata Pawłowska

Gdynia dnia 17.06.2023

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Wioletty Zielińskiej

pt.: „Rola kanału wapniowego TRPM2 w odpowiedzi komórek śródbłonna naczyniowego na warunki stresu oksydacyjnego”

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska mgr Wioletty Zielińskiej stanowi ciekawy etap badań nad mechanizmami regulującymi reakcję na stres oksydacyjny komórek śródbłonna w modelu *in vitro*. Doktorantka poddała wnikliwym eksperymentom molekularnym kanał wapniowy TRPM2 w komórkach śródbłonna linii EA.hy926 uzyskując wyniki mogące stanowić podstawę przyszłych terapii w chorobach naczyniowo-sercowych na podłożu lub przy współdziałaniu stresu oksydacyjnego.

Rozprawa doktorska mgr Wioletty Zielińskiej zawiera 149 stron tekstu w konwencjonalnej formie wstęp-cel pracy-metodyka-wyniki-dyskusja-wnioski-referencje. Zawiera 31 rycin i 7 tabel oraz 187 referencji. Na uwagę zasługuje fakt samodzielnego wykonania rycin do części teoretycznej na podstawie dostępnych materiałów, a nie kopiowanie tychże.

Pracę znamionuje przemyślany, następczy układ eksperymentów. Widać, że prace trwały przynajmniej 3 lata, co można wnioskować chociażby na podstawie daty zgody Niezależnej Komisji Bioetycznej. Na uwagę zasługuje fakt posiadania przez Doktorantkę dorobku naukowego o tematyce związanej z zakresem rozprawy i badaniami nad śródbłonkiem naczyń krwionośnych w postaci 5 artykułów w czasopismach filadelfijskich: The Role of TRPM2 in Endothelial Function and Dysfunction (Int J Mol Sci. 2021 Jul 16;22(14):7635; 1 autor), The Important Role of Endothelium and Extracellular Vesicles in the Cellular Mechanism of Aortic Aneurysm Formation (Int J Mol Sci. 2021 Dec 6;22(23):13157; 3 autor); CRISPR-Based Activation of Endogenous Expression of TPM1 Inhibits Inflammatory Response of Primary Human Coronary Artery Endothelial and Smooth Muscle Cells Induced by Recombinant Human Tumor Necrosis Factor α (Front Cell Dev Biol. 2021 Sep 17;9:668032; 2 autor); The effect of piperlongumine on endothelial and lung adenocarcinoma cells with regulated expression of profilin-1 (Onco Targets Ther. 2018 Nov 22;11:8275-8292; 3 autor); Cell-penetrating peptides and their utility in genome function modifications (Review) (Int J Mol Med. 2017 Dec;40(6):1615-1623; 2 autor).

Dr hab. n. med. inż. Piotr Wierzbicki



Założenie i cel pracy przedstawionej w rozprawie jest wynikiem solidnych podstaw teoretycznych i praktycznych. Wybór kanału wapniowego TRPM2 podparty jest odpowiednim wstępem teoretycznym. Cele pracy zaprezentowane są w sposób jasny poprzez określenie dwóch głównych etapów pracy mających dać odpowiedź na 5 głównych pytań (które są celami pracy).

Metodycznie pracy nie można nic zarzucić. Praca nad rolą TRPM2 w przedstawionej rozprawie jest bardzo kompleksowa. Zwykle w publikacjach odnoszących się do modulacji funkcji autorzy opierają się na obniżeniu / podniesieniu ekspresji z wykorzystaniem siRNA (lub innych metod) lub zastosowaniu inhibitorów danego enzymu/białka. W niniejszej pracy, Doktorantka zawarła oba te elementy, poszerzając pracę również o inhibicję enzymu PARP; enzymu aktywowanego w warunkach uszkodzenia DNA oraz niezbędnego w procesie aktywacji TRPM2.

Metodycznie zwraca uwagę fakt zastosowania siRNA celem inhibicji TRPM2 zamiast popularnej w ostatnich latach techniki CRISPR-Cas9. Moim zdaniem jest to zaleta z uwagi na znacznie korzystniejszy stosunek kosztów i czasu pracy w użytej technice w niniejszej pracy, szczególnie przy zastosowaniu specjalistycznego elektroporatora 4D-Nucleofectora będącego na stanie jednostki badawczej. Tu pojawia się pytanie – gdzie wykonywano prace? W jednym miejscu? Nie znalazłem tego w rozprawie a warto się tym pochwalić.

Intrygującym elementem jest dwukrotny zakup linii komórkowej z banku komórek. Jednakże znając specyfikę prac laboratoryjnych na liniach komórkowych oraz kilkuletni okres wykonywania eksperymentów, zakup ten jest całkowicie uzasadniony.

Elementem łączącym metodykę z wynikami jest krotkość powtórzeń technicznych. Dla większości oznaczeń zastosowano 6 lub 4 powtórzenia (3 dla fluorescencji i western blot), co jest odpowiednio reprezentatywną wartością – umożliwiającą zastosowanie właściwych i mocnych testów statystycznych (testy Wilcozona, Kruskal-Wallisa). Dane te znajdują się w metodyce, jednakże brakuje mi ich w legendzie rycin – liczba powtórzeń, rodzaj testu statystycznego i wobec czego jest liczony (domyślnie kontrola, ale nie zawsze).

Kolejnym wyróżniającym elementem jest fluorescencyjne znakowanie VE-kadheryny i F-aktyny. Pomimo uzyskania wyników poglądowych, zawarcie w pracy tych zdjęć niewątpliwie podnosi i tak już wysoką jakość rozprawy.

Moje drugie pytanie do pracy to zasadność wyboru stężeń inhibitorów. Czy kierowano się głównie przeżyciem komórki (tak zakładam) czy też inhibicją tego stanu (tego nie podejrzewam). Stąd też, wybrane stężenia kształtują się odpowiednio: inhibitory



concentration IC1-21 dla wybranych dalej inhibitorów, oraz IC62-88 dla odrzuconego związku 3-AB. Warto by przedstawić wybrane stężenia i ich IC w osobnej tabeli.

Pewną uwagę mam do wyników eksperymentu gojenia rany: ryciny 28 i 29 są zbyt małe, abym mógł się rozeznaczyć w wynikach. W opisie wyników Doktorantka napisała, iż „Zastosowane inhibitory wykazywały podobną skuteczność, co potwierdzono brakiem istotności statystycznej pomiędzy powierzchniami ran w monowarstwie komórek hodowanych w obecności poszczególnych inhibitorów TRPM2 albo PARP oraz nadtlenu wodoru.” Lecz nie mogę znaleźć odpowiednich wyników porównań statystycznych (w tabeli VII prawie wszystko jest $p < 0,05$). Być może nie umieszczono tych danych na wykresach, aby były bardziej czytelne?

Reasumując te części, oceniam je bardzo wysoko; wyników jest taka mnogość, że może warto by umieścić ich podsumowanie przed dyskusją?

Dyskusja jest napisana w sposób poprawny, zwraca uwagę fakt dużej wiedzy Doktorantki w temacie. Prawidłowo przedyskutowano uzyskane wyniki z danymi światowymi. Dla rozprawy doktorskiej format i objętość tej części pracy jest odpowiednio duża i reprezentatywna. Ciekawym elementem jest przedstawienie przez Doktorantkę dalszych planów i propozycji technicznego przeprowadzania eksperymentów celem rozszerzenia wiedzy w danym temacie roli śródbłonna w patologii naczyniowo-sercowej. To istotny plus pracy.

Doktorantka prawidłowo wyciągnęła i przedstawiła wnioski z przeprowadzonych prac. Najważniejszym elementem jest rekomendacja dalszych prac, w tym klinicznych, nad inhibitorami TRPM2 (oraz samym kanałem wapniowym) celem możliwości wprowadzenia nowych leków w chorobach naczyniowo-sercowych. Rekomendacja ta jest poparta wynikami całej pracy doktorskiej oraz publikacjami w czasopiśmie z listy filadelfijskiej, stąd też należałoby się spodziewać dalszych prac i być może wdrożeń w perspektywie kilkuletniej.

Reasumując, stwierdzam, iż przedstawiona mi do recenzji praca doktorska Pani mgr Wioletty Zielińskiej w rzetelny sposób dokumentuje przeprowadzone przez nią badania oraz spełnia wszystkie wymagania stawiane rozprawom na stopień doktora nauk medycznych w art 187 Ustawy Prawo o Szkolnictwie wyższym i nauce z dnia 20 lipca 2018 roku (Dz.U. 2018 poz. 1668 oraz Dz. U. z 2020 r. poz. 85, z późn. zm.).

Wnioskuje zatem do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauki Medyczne Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu o przeprowadzenie dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauk medycznych mgr Wioletcie Zielińskiej.

Dr hab. n. med. inż. Piotr Wierzbicki



Jednocześnie w uznaniu bardzo wysokiego poziomu pracy wnoszę do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauki Medyczne Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu o WYRÓŻNIENIE rozprawy doktorskiej mgr Wioletty Zielińskiej.

Dr hab. n. med. inż. Piotr Wierzbicki

Katedra i Zakład Histologii GUMed