

*Recenzja rozprawy
doktorskiej*

Przewodnicząca
Rady Dyscypliny Nauki Medyczne
Katarzyna Sierakowska
dr hab. Katarzyna Sierakowska, prof. UMK



ZAKŁAD MEDYCZYNY REGENERACYJNEJ I IMMUNOREGULACJI
UNIWERSYTET MEDYCZNY W BIAŁYMSTOKU
Wydział Lekarski
z Oddziałem Stomatologii i Oddziałem Nauczania w Języku Angielskim

Białystok, 30 czerwca 2023

Recenzja rozprawy na stopień doktora nauk medycznych
pt. „Rola kanału wapniowego TRPM2 w odpowiedzi komórek śródbłonka naczyniowego
na warunki stresu oksydacyjnego”
autorstwa mgr Wioletty Zielińskiej
realizowanej pod kierunkiem
dr hab. n. med. Macieja Gagata, prof. UMK

Śródbłonek naczyniowy to warstwa komórek wyściełających wewnętrzną powierzchnię naczyń krwionośnych. Jego główne funkcje to regulacja przepływu krwi, utrzymanie homeostazy i kontrola stanu zapalnego (poprzez regulację migracji leukocytów i wydzielanie czynników immunoaktywujących). Jego dysfunkcja związana jest z rozwojem m.in. chorób sercowo-naczyniowych oraz schorzeń neurodegeneracyjnych. Jedną z przyczyn prowadzących do powstania dysfunkcji śródbłonka naczyniowego jest stres oksydacyjny, który może aktywować kanały jonowe. Jednym z kanałów błonowych, którego aktywację obserwuje się w przebiegu stresu oksydacyjnego jest kanał potencjału receptora przejściowego dla melastatyny (TRPM2). Nie jest jednak jasne w jaki sposób modulacja aktywności TRPM2 może wpływać na funkcje nabłonka naczyniowego. W związku z powyższym wysoce interesująca i aktualna jest tematyka badań podjętych przez Panią mgr Wiolettę Zielińską.

Przedstawiona do recenzji rozprawa została przygotowana w języku polskim i ma układ charakterystyczny dla dysertacji na stopień naukowy doktora przygotowywanych w formie monografii. Na 148 stronach maszynopisu Doktorantka zawarła 10 rozdziałów obejmujących: wstęp, cel pracy, materiały i metody, wyniki, dyskusję, wnioski, streszczenie

w języku polskim, streszczenie w języku angielskim, zgodę komisji bioetycznej oraz spis piśmiennictwa. Całość poprzedza czytelny spis treści oraz wykaz stosowanych skrótów. Część graficzna obejmuje 31 rycin oraz 7 tabel. Pracę czyta się bardzo dobrze, gdyż przygotowana jest niezwykle starannie. Napisana jest poprawnie językowo i bardzo zrozumiale, co świadczy o swobodnym poruszaniu się Doktorantki w podejmowanej tematyce.

Wstęp rozprawy obejmuje 28 stron maszynopisu i wprowadza czytelnika w najbardziej istotne zagadnienia związane z tematem badawczym. Rozdział ten podzielony jest na 3 podrozdziały, a podrozdziały 2 i 3 na dodatkowe sekcje.

W podrozdziale 1.1 stanowiącym ogólne wprowadzenie do tematyki, Doktorantka opisuje funkcje śródbłonka naczyniowego skupiając się na jego roli bariery oraz wyjaśniając sposób jej modulacji przez stan zapalny. Wskazuje stres oksydacyjny jako jedną ze znanych przyczyn prowadzących do powstania dysfunkcji śródbłonka naczyniowego. W dalszej części skupia się na znaczeniu jonów wapniowych (Ca^{2+}) oraz kanałów wapniowych, opisując ich wpływ na stabilność białek z grupy katheryn oraz organizację cytoszkieletu.

W podrozdziale drugim Pani mgr Zielińska szczegółowo opisuje funkcje śródbłonka naczyniowego. W sekcji pierwszej podejmuje się charakterystyki najważniejszych białek odpowiedzialnych za tworzenie połączeń międzykomórkowych, opisuje aktywności parakrynnie komórek śródbłonka naczyniowego oraz interakcje z mięśniówką gładką, opisuje proces migracji komórek układu immunologicznego przez łożysko naczyniowe, a także procesy związane z tworzeniem nowych naczyń krwionośnych. W kolejnych sekcjach tego podrozdziału szczegółowo opisuje przyczyny prowadzące do dysfunkcji śródbłonka naczyniowego oraz rolę sygnalizacji jonów wapniowych.

W podrozdziale 3 Doktorantka charakteryzuje rolę błonowego kanału wapniowego TRPM2, opisując znane izoformy tego białka, charakteryzując jego strukturę, opisując mechanizmy aktywacji, charakteryzując jego rolę w funkcjonowaniu bariery śródbłonka naczyniowego, a także opisując metody jego inhibicji. Odbiór podrozdziału ułatwiają dwie bardzo przejrzyste ryciny oraz tabela.

W rozdziale 2 przedstawiono cel podjętych badań, którym była ocena znaczenia kanału wapniowego TRPM2 w kontekście funkcjonowania i odpowiedzi komórek śródbłonka na warunki stresu oksydacyjnego, jak również ocena możliwości potencjalnego wykorzystania inhibitorów TRPM2 i PARP w prewencji i terapii chorób układu krążenia związanych z dysfunkcją śródbłonka. Cel główny uzupełniają pytania naukowe, które można potraktować

jako cele szczegółowe pracy. Pani mgr Zielińska postanowiła odpowiedzieć na następujące pytania: 1) Jak indukcja stresu oksydacyjnego imitowana nadtlaniem wodoru wpływa na komórki śródbłona linii EA.hy926? 2) Jakie znaczenie ma obniżenie poziomu błonowego kanału wapniowego TRPM2 w kontekście funkcjonowania komórek linii EA.hy926?; 3) Czy obniżenie poziomu TRPM2 wpływa na odpowiedź komórek śródbłona na działanie nadtlenu wodoru? 4) Czy możliwe jest zahamowanie aktywności TRPM2 poprzez zastosowanie wybranych inhibitorów kanału lub inhibitorów enzymu PARP? 5) Czy kanał TRPM2 może być rozważany jako potencjalny cel terapeutyczny w prewencji i leczeniu chorób, których podłożem jest dysfunkcja śródbłona?

Rozdział trzeci „Materiały i Metody” stanowi 13 stronicowy opis materiału badawczego oraz metod analitycznych wykorzystywanych podczas realizacji projektu doktorskiego. Rozdział podobnie jak wstęp podzielony został na podrozdziały.

W podrozdziale 3.1 Doktorantka opisuje materiał badawczy oraz sposób prowadzenia hodowli komórkowej. Do badań wykorzystano komórki linii EA.hy926. Zaproponowany model badawczy jest powszechnie wykorzystywany w badaniach nad śródbłonkiem naczyniowym, a linia komórkowa EA.hy926 uznawana jest za dość dobrze odzwierciedlającą funkcję komórek pierwotnych śródbłona naczyniowego. Komórki hodowano zgodnie z zaleceniami producenta. Na szczególną uwagę zasługuje tutaj prowadzona przez Doktorantkę kontrola jakości i stabilności linii co świadczy o wysokiej świadomości oraz wiedzy praktycznej z zakresu stosowania hodowli *in vitro*. W podrozdziale 3.2 Doktorantka prezentuje sposoby stymulacji komórek wykorzystywane podczas realizacji projektu doktorskiego. Opis przygotowania inhibitorów został dodatkowo wzbogacony o czytelną tabelę. W podrozdziale 3.3. opisano sposób transfekcji komórek. Transfekcję prowadzono z wykorzystaniem komercyjnie dostępnych plazmidów oraz zestawu do elektroporacji. Doktorantka szczegółowo opisuje proces przygotowania komórek oraz odwołuje się do wcześniejszych eksperymentów optymalizujących procedurę transfekcji. Nie prezentuje jednak wyników przeprowadzonych optymalizacji. Zgodnie z opisem efektywność transfekcji oceniano na podstawie obecności fluorescencji pochodzącej od białka GFP. W tym miejscu pojawiają się jednak pytania, które wymagają uszczegółowienia, mianowicie:

1) Czy stosowano kryteria jakościowe dotyczące żywotności oraz efektywności transfekcji pozwalające na włączenie komórek do dalszych eksperymentów?;

2) Czy komórki były transfekowane bezpośrednio przed ich wykorzystaniem w dalszych eksperymentach czy podlegały kriokonserwacji i ponownej hodowli? Jeśli tak, to jak długo hodowano komórki i czy miało to wpływ na poziom ekspresji TRPM2?

3) Czy w procesie optymalizacji transfekcji oceniano również poziom wyciszania genu TRPM2? Będę wdzięczny za odniesienie się do powyższych pytań.

W kolejnych podrozdziałach Doktorantka opisuje wykorzystywane metody analityczne obejmujące: test cytotoksyczności MTT, cytometryczną ocenę indukowanej śmierci komórki, cytometryczną ocenę rozkładu faz cyklu komórkowego, pomiar poziomu jonów wapnia, test chemotaksji komórek, test gojenia ran (test zarastania), sposoby znakowania białek, a także metodę western blot oraz opisuje metody statystyczne wykorzystywane do analizy danych. Dodatkowo mgr Zielińska charakteryzuje wykorzystane w badaniach przeciwciała. Z obowiązku recenzenta muszę zwrócić uwagę, że dobrym zwyczajem podczas opisu metod cytometrycznych jest zaprezentowanie przykładowych cytogramów z przeprowadzonych analiz. Cytogramy te powinny obrazować wykorzystane bramkowanie komórek podczas analizy (m.in. sposób dyskryminacji dubletów, i selekcję komórek na podstawie ich morfologii) oraz zastosowane kontrole wykonanych barwień pozwalające na odpowiednie ustawienie regionów zainteresowania podczas analizy (tzw. bramek).

Przedstawione opisy wykorzystanych materiałów i użytych metod nie budzą wątpliwości, są szczegółowe i umożliwiają ich odtworzenie w razie potrzeby. Szeroki wachlarz metod badawczych oraz odpowiedni ich dobór świadczą o doskonałym przygotowaniu Doktorantki do pracy laboratoryjnej. Pojawiające się w tej części recenzji pytania nie stanowią zarzutów merytorycznych są jedynie prośbą o uzupełnienie informacji.

Rozdział „Wyniki” składa się z 2 podrozdziałów podzielonych na liczne sekcje w których Doktorantka przedstawia rezultaty przeprowadzonych analiz laboratoryjnych.

W podrozdziale pierwszym mgr Zielińska opisuje wyniki analiz przeprowadzonych w komórkach EA.hy926 o niezmienionej ekspresji białka TRPM2 oraz komórkach transfekowanych siRNA. Opis uzyskanych wyników rozpoczyna ocena efektywności transfekcji komórek z wykorzystaniem elektroporacji, którą oceniano na podstawie ilości komórek wykazujących ekspresję GFP. W mojej ocenie wyniki powinny zostać poszerzone o analizę poziomu białka TRPM2 w transfekowanych komórkach w odniesieniu do komórek nietransfekowanych. W dalszej części pracy opisano wyniki analizy żywotności komórek po zastosowaniu różnych stężeń nadtlenu wodoru. Na podstawie

wykonanych analiz do dalszych badań wybrano stężenie 100uM. Stężenie to stanowiło najniższe analizowane, dla którego zaobserwowano istotne statystycznie obniżenie przeżywalności komórek w odniesieniu do kontroli badania. W dalszej części mgr Zielińska oceniła odsetek komórek znajdujących się w różnych fazach apoptozy. W związku z brakiem istotnych różnic pomiędzy komórkami nietransfekowanymi, a transfekowanymi kontrolnym siRNA, postanowiła w dalszych etapach pracy odwoływać się jedynie do komórek nietransfekowanych jako kontroli badania.

W dalszej części tego rozdziału Doktorantka opisuje wyniki analiz wewnątrzkomórkowego poziomu jonów wapnia po stymulacji nadtlaniem wodoru, wskazując na różnice pomiędzy komórkami o niezmienionej ekspresji TRPM2 oraz komórkami z obniżoną ekspresją badanego kanału błonowego. W tym miejscu dziwi brak podsumowania uzyskanych wyników w postaci zbiorczych wykresów i analiz statystycznych. Pani mgr Zielińska zaobserwowała również różnice w chemotaksji komórek stymulowanych nadtlaniem wodoru, a także w zakresie VE-katheryny oraz F-aktyny, które wydają się zależeć od aktywności kanału jonowego TRPM2.

W drugim podrozdziale mgr Zielińska opisuje wyniki analiz przeprowadzonych z wykorzystaniem inhibitorów kanału TRPM2 (ACA oraz FFA) oraz enzymu PARP (3-AB oraz DPQ). Co ciekawe, wszystkie wybrane inhibitory były toksyczne dla wykorzystywanej linii komórkowej. Najwyższą toksyczność zaobserwowano po zastosowaniu inhibitora 3-AB, który został wyeliminowany z dalszych analiz. Pozostałe związki nie powodowały obniżenia żywotności poniżej 79% co pozwoliło na ich wykorzystanie w dalszych badaniach funkcjonalnych. W dalszej części opisano wyniki analiz morfologii komórek, apoptozy, cyklu komórkowego, analiz fluorescencyjnych, western blot, a także chemotaksji i migracji komórek poddawanych działaniu wybranych inhibitorów oraz stymulowanych nadtlaniem wodoru. Uzyskane rezultaty wskazują, iż zastosowanie analizowanych inhibitorów TRPM2 oraz inhibitora PARP działa protekcyjnie na komórki EA.hy926 podobnie jak miało to miejsce w przypadku zastosowania transfekcji obniżającej ekspresję TRPM2. W zakresie analiz cyklu komórkowego dziwić może brak podsumowania uzyskanych wyników w formie wykresu zbiorczego z analizą statystyczną. Natomiast, podczas prezentacji graficznej analiz western blot Doktorantka nie uwzględniła reprezentatywnych membran jak miało to miejsce na rycinie 12.

Wyniki zostały omówione wyczerpująco w szerokiej i krytycznej dyskusji opartej o współczesne, dobrze dobrane piśmiennictwo. Przeprowadzona dyskusja świadczy o dużej wiedzy Pani mgr Wiolety Zielińskiej, jej dojrzałości naukowej oraz krytycznym podejściu do uzyskanych wyników.

Podsumowanie pracy stanowi 6 wniosków, odpowiadających na założony cel badań i postawione pytania naukowe. Wnioski są trafnie sformułowane i poparte uzyskanymi wynikami przeprowadzonych przez Doktorantkę badań.

Reasumując stwierdzam, że przedłożona mi do oceny rozprawa doktorska jest opracowaniem niezwykle ciekawym, aktualnym, oryginalnym i inspirującym do dalszych badań. Wskazane w recenzji nieliczne uwagi, które wymagają jedynie doprecyzowania, nie wpływają na jakość merytoryczną uzyskanych wyników, które oceniam bardzo wysoko.

Niniejszym stwierdzam, iż przygotowana przez Panią mgr Wioletę Zielińską rozprawa doktorska spełnia wymogi określone w art. 13. Ustawy z dnia 14 marca 2013 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki. Wnoszę więc do Wysockiej Rady Dyscypliny Nauki Medyczne Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu o dopuszczenie Pani mgr Wiolety Zielińskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ponadto z uwagi na oryginalność przeprowadzonych badań, ich szeroki zakres metodyczny oraz potencjał praktyczny, składam wniosek o wyróżnienie niniejszej rozprawy.

Białystok, 30.06.2023

dr hab. Andrzej Eljaszewicz

 **PODPIS ZAUFANY**
ANDRZEJ JÓZEF
ELJASZEWICZ
25.07.2023 12:29:40 GMT+2
Dokument podpisany elektronicznie
podpisem zaufanym