

Kraków 02-02-2020



UNIwersYTET
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

Prof. dr hab. n. med. Krzysztof J. Filipiak

Przewodniczący

Rady Dyscypliny Nauk Medycznych WUM

Wielce Szanowny Panie Profesorze,

W załączeniu przesyłam 3 egzemplarze oceny rozprawy doktorskiej pana **lek. med. Michała Kowarę** zatytułowanej *"Czynniki regulujące strukturę blaszki miażdżycowej"* wykonanej w Katedrze i Zakładzie fizjologii Doświadczalnej i Klinicznej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego pod opieką promotorską prof. Agnieszko Cudnoch-Jędrzejewskiej

Instytut Fizyki
im. Mariana Smoluchowskiego

Zakład Fizyki Medycznej

Kierownik Zakładu

Ewa Lucja Stępień
dr hab. n. med., prof. UJ
e-mail: e.stepien@uj.edu.pl

Z poważaniem

Ewa Stępień

tel. sekr. 12 664 46 40
bezp. 12 664 47 62
ul. Łojasiewicza 11
30-348 Kraków



UNIWERSYTET
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

Ocena rozprawy doktorskiej

"Czynniki regulujące strukturę blaszki miażdżycowej"

wykonanej przez **lek. med. Michała Kowarę**

w Katedrze i Zakładzie fizjologii Doświadczalnej i Klinicznej Warszawskiego
Uniwersytetu Medycznego
pod opieką promotorską prof. Agnieszko Cudnoch-Jędrzejewskiej

Kiedy w 1993 roku Victor Ambrose i Gary Ruvkun opublikowali po raz pierwszy w swoich artykułach w czasopiśmie Cell dowody na to, że istnieją geny kodujące krótkie cząsteczki RNA o sekwencjach komplementarnych do innych genów i działają regulująco na ich aktywność, w biologii dokonał się przełom. Ich badania przeprowadzone na modelowym organizmie *C. elegans* obaliły kolejny paradygmat biologii, że geny to cząsteczki DNA kodujące białka. Późniejsze badania Andrew Z. Fire'go i Craiga C. Mello pokazały, że te krótkie jednoniciowe „fragmenty RNA” mają określoną sekwencję i wielkość, co pozwala na interferencje mikroRNA, jak później nazwano te cząsteczki, z transkryptami genowymi, w sposób specyficzny i wielokierunkowo. Opisanie tych epigenetycznych mechanizmów regulacji zostało nagrodzone Nagrodą Nobla z Fizjologii lub Medycyny w 2006 roku. Od tej pory badania nad mikroRNA nabrały tempa, i zaczęto poszukiwać związku między swoistymi sekwencjami mikroRNA, a znanych ich jest ponad 1900 ludzkich sekwencji mikroRNA, a różnymi procesami patofizjologicznymi, w tym rozwoju miażdżycy, czy przebudowie blaszki miażdżycowej.

Rozprawa doktorska **lek. med. Michała Kowary** wpisuje się w najnowsze trendy badań naukowych zmierzających do poszukiwania uniwersalnych mechanizmów regulujących proces powstawania zmian miażdżycowych, od poziomu molekularnego (cząsteczka miR-21-5p) do poziomu odpowiedzi komórkowej i tkankowej (ekspresja białek hamujących dla enzymów proteolitycznych TIMP-3 i RECK), zmierzających do zwiększenia ryzyka powikłań wieńcowych, skutkujących ostrym zespołem wieńcowym lub niestabilną chorobą wieńcową.

Tak przyjęte założenia zmierzające do opisania patomechanizmu rozwoju miażdżycy, w oparciu o hipotezę zakładającą wpływ czynników modyfikujących ekspresję genów w ścianie naczynia już od pierwszych lat życia człowieka, zostały ujęte w celach badawczych rozprawy doktorskiej.

Instytut Fizyki
im. Mariana Smoluchowskiego

Zakład Fizyki Medycznej

Kierownik Zakładu

Ewa Łucja Stępień
dr hab. n. med. prof. UJ
e-mail: e.stepien@uj.edu.pl

tel. sekr. 12 664 46 40
bezp. 12 664 47 62
ul. Łojasiewicza 11
30-348 Kraków

Forma rozprawy doktorskiej

Złożona do oceny rozprawa doktorska na postać zbioru trzech opublikowanych i powiązanych tematycznie artykułów opublikowanych w czasopiśmie o łącznym współczynniku oddziaływania (IF) 5,088:

1: **Kowara M**, Cudnoch-Jedrzejewska A, Opolski G, Włodarski P. MicroRNA regulation of extracellular matrix components in the process of atherosclerotic plaque destabilization. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2017 Jul;44(7):711-718.

2: **Kowara M**, Paskal W, Gondek A, Głównczyńska R, Opolski G, Włodarski P, Cudnoch-Jedrzejewska A. Increased serum microRNA-21 levels reflect cardiac necrosis rather than plaque vulnerability in patients with acute coronary syndrome: a pilot study. *Kardiol Pol*. 2019 Nov 22;77(11):1074-1077.

3: **Kowara M**, Kasarek K, Czarasta K, Opolski G, Cudnoch-Jedrzejewska A. Early-life inflammation pathways trigger a cascade leading to development of atherosclerotic plaque through the "butterfly effect" - An hypothesis. *Med Hypotheses*. 2019 Jan;122:106-110.

Doktorant, w załączonych oświadczeniach współautorów zadeklarował znaczący wkład merytoryczny w opublikowane prace, kolejno: 60, 55 i 60%.

Pracę rozpoczyna obszernie Streszczenie w języku polskim i angielskim, zawierające m.in. cele pracy sprecyzowane w 3 punktach. Kolejno, Wstęp, Założenia i Cele pracy, kopie opublikowanych prac, Dyskusja, Wnioski i podsumowanie, Piśmiennictwo i Oświadczenia współautorów, w formie tabeli. Piśmiennictwo w liczbie 52 cytowanych artykułów oryginalnych i przeglądowych odnosi się do treści Wstępu i Dyskusji, i jest aktualnym przeglądem prac z obszaru badań **Doktoranta**. Na uwagę zasługuje odwołanie się również do polskich rejestrów danych zawałów serca, co przybliży kontekst kliniczny i epidemiologiczny w interpretacji przedstawionych wyników. Dzięki tak zaplanowanej strukturze pracy, jest ona zwięzła i przejrzysta dla czytelnika.

Ocena treści merytorycznych rozprawy doktorskiej

Niewątpliwą zaletą przedstawionej do oceny pracy jest złożenie trzech powiązanych tematycznie artykułów, o spójnej treści i w zamierzeniu realizujących zadane przez **Doktoranta** cele. Pierwszy artykuł (*Clin Exp Pharmacol Physiol* 2017) jest gruntownym i w miarę aktualnym przeglądem stanu wiedzy w oparciu o dostępną literaturę, opisującym udział wybranych mikroRNA w ekspresji białek macierzy zewnątrzkomórkowej oraz enzymów proteolitycznych zaangażowanych w tworzenie i przebudowę ściany naczynia oraz blaszki miażdżycowej. W rzeczy samej, ta praca przeglądowa opiera się o doświadczenia na zwierzętach (myszy z *knockoutami* genowymi), co jak do tej pory jest najlepszym modelem do badań nad patogenezą miażdżycy. Dla uaktualnienia stanu wiedzy na rok 2019, brakuje we wstępie przeniesienia



UNIWERSYTET
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

Instytut Fizyki
im. Mariana Smoluchowskiego

Zakład Fizyki Medycznej

Kierownik Zakładu

Ewa Lucja Stępień
dr hab. n. med. prof. UJ
e-mail: e.stepien@uj.edu.pl

tel. sekr. 12 664 46 40
bezp. 12 664 47 62
ul. Łojasiewicza 11
30-348 Kraków

(*translacji*) tych badań modelowych na sytuację kliniczną, tym bardziej, że dzięki badaniom bioinformatycznym zidentyfikowano nowe mikroRNA regulujące ekspresję różnych białek zaangażowanych w przebudowę blaszki, w tym TIMP-3. Takie ujęcie wzmocniłoby wartość merytoryczną wstępu.

Dla równowagi, w części dyskusji, **Doktorant** odniósł się do obrazu klinicznego w opisie roli mikroRNA w aktywności metaloproteinaz przez białko hamujące TIMP-3 (MMP-9).

Publikacja eksperymentalna pokazuje, że zwiększone poziomy krążącego małego niekodującego RNA hsa-miR-21-5p charakteryzują pacjentów z zawałem STEMI, w odróżnieniu do chorych z niestabilną i stabilną chorobą wieńcową (*Kardiologia Polska* 2019). Może to świadczyć o ważnej roli tego mikroRNA w procesach proteolizy i przebudowy blaszki. Niestety, z przedstawionych w rozprawie publikacji, oraz ich komentarza, nie wynika bezpośrednio, że tym celem dla zwiększonej ekspresji hsa-miR-21-5p w zawale jest właśnie aktywność MMP-9, jak sugeruje doktorant w dyskusji i posumowaniu wyników. Dla ugruntowania tej hipotezy brakuje wyników aktywności MMP-9, choćby w postaci badań zymograficznych surowicy od tych pacjentów. Może okazałoby się, że blokowana jest aktywność innej metaloproteiny?

Trzecia publikacja dotyczy efektu wzmocnienia czynników miażdżycowych poprzez wczesnodziecięce działanie prozapalne, które może pozagenomowo (epigenetycznie) wpłynąć na przyspieszenie lub spowolnienie procesów miażdżycowych. **Doktorant** nazwał ten proces wzmocnienia „efektem motyla”, bardzo odważnie, choć może słusznie przy założeniu, że czynniki wzmacniające wymykają się spod kontroli procesów fizjologicznych i wywołują chaos deterministyczny. Do opisu tego efektu, **Doktorant** posłużył się wieloma przykładami z epidemiologii i badań eksperymentalnych na modelach zwierzęcych, unikając jednak próby wprowadzenia modelu wyjaśniającego choćby warunki brzegowe takiego procesu. Co mogłoby być takim warunkiem brzegowym? Na pewno siła oddziaływania bodźców środowiskowych, jak wartość kaloryczna posiłków, ilość wypalanych papierosów przez matkę o okresie prenatalnym, są czynnikami wyzwalającymi ten efekt. Opisanie ilościowo tych zależności, czyli dopasowanie modelu, byłoby nie lada zadaniem, które bardzo wzmocniłoby tę hipotezę. I tego w publikacji brakuje. Sama publikacja broni się liczbą przytoczonych przykładów i próbą uogólnienia tych zjawisk, być może pierwszą taką próbą. Sam **Doktorant** odwołuje się do konieczności opracowania takiego modelu, co nie byłoby proste, ale jak pociągające dla próby rozwiązania zjawisk wydawałoby się stochastycznych (przypadkowe genotypy poddane przypadkowym bodźcom środowiskowym), które w rzeczywistości ulegają deterministycznemu wpływowi chaosu.



UNIWERSYTET
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

Instytut Fizyki
im. Mariana Smoluchowskiego

Zakład Fizyki Medycznej

Kierownik Zakładu

Ewa Łucja Stepien
dr hab. n. med. prof. UJ
e-mail: e.stepien@uj.edu.pl

tel. sekr. 12 664 46 40
bezp. 12 664 47 62
ul. Łojasiewicza 11
30-348 Kraków

Dyskusja przedstawiona w pracy doktorskiej nie oddaje tej próby wybronięcia postawionej hipotezy. Jest przyczynkiem do dalszych rozważań, co może być wykorzystane przed Doktorantą w kolejnych projektach badawczych.

Podsumowując moją ocenę stwierdzam, że rozprawa stanowi cykl wartościowych i nowatorskich publikacji naukowych w dyscyplinie nauk medycznych, opisuje zależności między czynnikami regulującymi strukturę macierzy zewnątrzkomórkowej w obrębie blaszki miażdżycowej.

W związku z powyższym, zwracam się do Rady Dyscypliny Nauk Medycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego z wnioskiem o dopuszczenie Pana **lek. med. Michała Kowarę** do dalszych etapów przewodu doktorskiego i wnioskuję o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu, dyscyplina nauki medyczne, w myśl obowiązującej ustawy.


dr hab. n. med. Ewa Łucja Stepień
Profesor Uniwersytetu Jagiellońskiego



UNIWERSYTET
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

Instytut Fizyki
im. Mariana Smoluchowskiego

Zakład Fizyki Medycznej

Kierownik Zakładu

Ewa Łucja Stepień
dr hab. n. med. prof. UJ
e-mail: e.stepien@uj.edu.pl

tel. sekr. 12 664 46 40
bezp. 12 664 47 62
ul. Łojasiewicza 11
30-348 Kraków