



Białystok 10.02.2020

Recenzja rozprawy na stopień doktora nauk medycznych

lek. Michała Kowary p.t.:

**„Czynniki regulujące strukturę macierzy zewnątrzkomórkowej
w obrębie blaszki miażdżycowej.”**

„The factors regulating extracellular matrix structure within atherosclerotic plaque”

Choroba wieńcowa i jej konsekwencje, wraz z innymi manifestacjami miażdżycy, takimi jak udary mózgu czy niedokrwienie kończyn dolnych są najczęstszą przyczyną zgonów i niepełnosprawności w społeczeństwach zachodnich. Obecnie uważa się, iż głównym elementem wpływającym na rozwój miażdżycy jest przewlekły stan zapalny. Wpływa on zarówno na narastanie blaszki i wolne zawężanie światła naczynia, jak też na ryzyko wystąpienia nagłego pęknięcia blaszki i nagłej aktywacji procesów krzepnięcia prowadzących do ostrego niedokrwienia położonych dystalnie tkanek. Oba zjawiska są uzależnione od równowagi pomiędzy czynnikami stymulującymi tworzenie macierzy zewnątrzkomórkowej oraz czynnikami nasilającymi jej degradację. Rozróżnienie mechanizmów zawiadujących tymi procesami może pozwolić na bardziej skuteczne leczenie osób zagrożonych miażdżycą oraz jej konsekwencjami. W tym aspekcie poszukiwania czynników regulujących strukturę macierzy zewnątrzkomórkowej w obrębie blaszki miażdżycowej uważam za niezwykle interesujące zarówno z klinicznego, jak i naukowego punktu widzenia.

Przedstawiona praca jest rozprawą doktorską opartą na opublikowanych wcześniej, recenzowanych pracach. Jest napisana na 39 stronach maszynopisu, zawiera w tym kopie 3 opublikowanych wcześniej artykułów oraz 52 pozycje piśmiennictwa. Jej układ jest niestandardowy i obejmuje następujące rozdziały: spis treści, streszczenia w języku polskim, wstęp, założenia i cele pracy, kopie publikacji będących podstawą rozprawy, krótką dyskusję, wnioski i podsumowanie oraz piśmiennictwo. Ponadto załączono oświadczenia autorów potwierdzające ich zgody na użycie prac w rozprawie doktorskiej oraz opisujące udział każdego z nich w badaniach. Praca jest starannie przygotowana pod względem edytorskim.

Na początku pracy umieszczone zostały streszczenia w języku polskim i angielskim.

Kolejnym rozdziałem jest wstęp zawierający krótkie wprowadzenie do tematu badań. Autor opisuje patogenezę miażdżycy, przybliża rolę lokalnego stanu zapalnego w regulacji białek macierzy zewnątrzkomórkowej, a także konsekwencje pęknięcia blaszki miażdżycowej i ostrego niedokrwienia. W kolejnych podrozdziałach podsumowano epidemiologię chorób o podłożu miażdżycowym oraz strategię poszukiwania czynników wpływających na rozwój i stabilność blaszki miażdżycowej. Całość ukazuje kontekst projektu i jego znaczenie dla nauki i kliniki.

W kolejnym rozdziale zatytułowanym „Założenia i cele pracy” autor w skrócie opisał czego dotyczyły poszczególne publikacje. Przedstawił też główne założenie jako: „...podkreślenie ważnej roli molekularnych szlaków wewnątrz- i zewnątrzkomórkowych regulujących ekspresję genów kodujących białka macierzy zewnątrzkomórkowej oraz modyfikujących mikrośrodowisko zewnątrzkomórkowe w procesie rozwoju i destabilizacji blaszki miażdżycowej.”

W dalszej części umieszczone są kopie opublikowanych prac. W pierwszej z nich: „MicroRNA regulation of extracellular matrix components in the proces of atherosclerotic plaque destabilisation”, opublikowanej w *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* Doktorant podsumował aktualny stan wiedzy na temat sposobów regulacji substancji wchodzących w skład macierzy zewnątrzkomórkowej w blaszce miażdżycowej. Szczególną uwagę zwrócił na mechanizmy prowadzące do pęknięcia blaszki miażdżycowej i rolę w tym procesie cząsteczek microRNA.

W kolejnej pracy “Increased serum microRNA-21 levels reflect cardiac necrosis rather than plaque vulnerability in patients with acute coronary syndrome: a pilot study.”, opublikowanej w *Kardiologii Polskiej*, autorzy wykazali wyższe stężenia microRNA-21 u pacjentów z zawałem mięśnia sercowego z uniesieniem ST w stosunku do stabilnej choroby wieńcowej, dławicy niestabilnej, jak też do grupy kontrolnej.

Ostatnia praca włączona do przedłożonej dysertacji „Early-life inflammation pathways trigger a cascade leading to development of atherosclerotic plaque through the "butterfly effect" - An hypothesis.”, została opublikowana w *Medical Hypotheses*. Jest to niezwykle ciekawa praca pogładowa, która w sposób twórczy analizuje dostępne informacje i stawia szeroko zarysowaną hipotezę sugerującą, iż wczesne zmiany w odpowiedzi zapalnej

(szczególnie odnośnie populacji monocytów) mogą mieć dalekosiężne konsekwencje dotyczące zaburzenia produkcji składników macierzy zewnątrzkomórkowej, prowadzących do niestabilności blaszki miażdżycowej.

Następnie, w krótkiej dyskusji Doktorant podsumowuje uzyskane wyniki i zestawia je z danymi literaturowymi, tłumacząc w jaki sposób doszedł do sformułowanej przez siebie hipotezy, opublikowanej w 3 pracy. Warto zauważyć, iż Autor krytycznie podchodzi do przeprowadzonych przez siebie badań, przedstawiając zarówno ich mocne strony, jak i omawiając ograniczenia takie jak niska liczebność grupy badanej.

Do wniosków z przeprowadzonych badań Autor zalicza:

1. „Cząsteczki mikro-RNA regulujące ekspresję białek matrycowych oraz regulacyjnych macierzy zewnątrzkomórkowej mają wpływ na proces rozwoju i destabilizacji blaszki miażdżycowej.”
2. „Poziom ekspresji cząsteczki mikro-RNA hsa-miR-21-5p, będącej induktorem MMP-9 jest zwiększony w surowicy pacjentów z zawałem serca STEMI w porównaniu do chorych z niestabilną dławicą (UA) oraz do pacjentów ze stabilną chorobą wieńcową (SCAD) przy braku różnic między dwoma ostatnimi grupami, co wskazuje na rolę hsa-miR-21-5p w procesach modulacji macierzy zewnątrzkomórkowej zaistniałej w warunkach martwicy mięśnia sercowego.”
3. „Charakter procesów molekularnych zachodzących w obrębie blaszki miażdżycowej oraz wyniki badań klinicznych sugerują, że czynniki działające na wczesnym etapie życia osobniczego mogą mieć długofalowy wpływ stymulujący bądź hamujący na proces progresji i destabilizacji blaszki miażdżycowej poprzez wywoływanie długofalowych zmian epigenetycznych modyfikujących mikrośrodowisko ścian naczyń krwionośnych.”

Za bardzo cenny element pracy doktorskiej lek. Michała Kowary uważam rycinę przedstawiającą postulowaną koncepcję badań sieci szlaków molekularnych w obrębie blaszki miażdżycowej. Autor pokazuje w niej, iż należy nie tylko koncentrować się na badaniach biochemicznych i molekularnych, ale po identyfikacji szlaków zależności oraz pętli zwrotnych warto kontynuować pracę *in silico* przy opracowywaniu nowych modeli i projektowaniu dalszych badań.

Dysertację kończy piśmiennictwo, a dalej zamieszczono kopie oświadczeń współautorów.

Z obowiązku recenzenta chciałbym zwrócić uwagę na pewne drobne niedociągnięcia

- W streszczeniu Autor pisze: "Rozerwanie blaszki miażdżycowej manifestuje się klinicznie jako ostry zespół wieńcowy...". Jest zbyt duże uproszczenie, gdyż pomimo że uznaje się pęknięcie blaszki za najczęstszą przyczynę OZW, to większość epizodów pęknięcia blaszki miażdżycowej jest niema i nie prowadzi do zauważalnych objawów klinicznych. (m.in. Bentzon et al. *Circulation Research*. 2014;114:1852–1866). Z drugiej strony warto pamiętać, iż coraz częściej spotykamy się z OZW niespowodowanymi pęknięciami blaszki, tylko erozją jej powierzchni, zmianami zwapniałymi, czy spontanicznym rozwarstwieniem naczyń.
- Również w streszczeniu autor określa pracę „Early-life inflammation pathways trigger a cascade leading to development of atherosclerotic plaque through the "butterfly effect" - An hypothesis.” jako pracę oryginalną. Jest to oczywiście wartościowa praca naukowa, doskonały przykład pracy, w której przegląd literatury owocuje nową hipotezę, jednakże nie ma w niej kluczowego elementu dla pracy oryginalnej jakim jest weryfikacja hipotezy i oryginalne wyniki eksperymentu.
- Jako założenie pracy Autor podaje : „...podkreślenie ważnej roli molekularnych szlaków...”. Takie początkowe założenie sugeruje brak obiektywizmu, gdyż autor a priori zakłada ważną rolę badanych czynników. Jest zapewne niefortunne sformułowanie chęci badań istotnych elementów patogenezы miażdżycы.
- Na stronie 32 Doktorant używa sformułowania: „białek matrycowych”. Nie jest ono przyjęte w polskiej literaturze medycznej. Sugeruje, iż istnieją białka będące matrycą, czyli wzorcem do tworzenia innych białek, tak jak mRNA (niekiedy nazywane RNA matrycowym). Jest to zapewne kalka angielskiego „matrix protein” czyli białka macierzy – białka strukturalne wchodzące w skład macierzy zewnątrzkomórkowej.
- Mam pewne zastrzeżenia do drugiego wniosku, w którym Autor pisze: „... co wskazuje na rolę hsa-miR-21-5p w procesach modulacji macierzy zewnątrzkomórkowej zaistniałej w warunkach martwicy mięśnia sercowego.” Jest to stwierdzenie na wyrost, które ni zostało poparte wynikami uzyskanymi w tej pracy. Oczywiście, bazując na danych literaturowych, iż hsa-miR-21-5p regulując ekspresję białek zewnątrzkomórkowych, w tym MMP-9 wpływa na przemiany macierzy zewnątrzkomórkowej, a także na przedstawionych wynikach, iż u pacjentów ze STEMI dochodzi do zwiększonego stężenia

hsa-miR-21-5p w krwi, można sformułować hipotezę przedstawioną przez Autora. Jednak wymagać ona będzie udowodnienia. Bardziej właściwym (choć nadal dość odważnym i nie do końca udowodnionym) wnioskiem byłoby proste stwierdzenie z tytułu pracy, iż stężenie hsa-miR-21-5p w większym stopniu odzwierciedla martwicę niż niestabilność blaszki.

Wzmiankowane niedociągnięcia nie wpływają istotnie na moją pozytywną ocenę wartości merytorycznej pracy doktorskiej lek. Michała Kowary.

Przedstawiona seria publikacji jest spójnym tematycznie i metodycznie oryginalnym rozwiązaniem problemu naukowego, wnosi istotny wkład do nauki, a także jest świadectwem wysokiego poziomu wiedzy teoretycznej oraz umiejętności praktycznych Doktoranta w zakresie nauk medycznych. Równocześnie udowadnia Jego umiejętności w zakresie samodzielnego prowadzenia pracy naukowej.

Przedstawiona do oceny rozprawa na stopień doktora nauk medycznych lek. Michała Kowary p.t.: „Czynniki regulujące strukturę macierzy zewnątrzkomórkowej w obrębie blaszki miażdżycowej.”, moim zdaniem, jest oryginalnym rozwiązaniem problemu naukowego, świadczy o wysokim poziomie wiedzy teoretycznej Doktoranta w zakresie nauk medycznych oraz udowadnia Jej umiejętności w zakresie samodzielnego prowadzenia pracy naukowej, przez co spełnia warunki określone w art. 13 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. Nr 65, poz.595 z późniejszymi zmianami). Mam zatem zaszczyt wystąpić do Rady Dyscypliny Nauki Medyczne Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego z wnioskiem o dopuszczenie lek. Michała Kowary do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Prof. dr hab. n. med. Karol Adam Kamiński