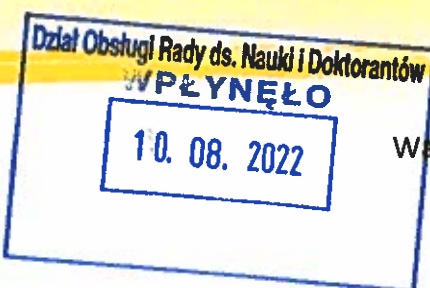




CENTRUM ZDROWIA DZIECKA

Instytut „Pomnik - Centrum Zdrowia Dziecka”
Al. Dzieci Polskich 20, 04-730 Warszawa
T: 22 815 70 00; F: 22 815 15 10
www.czd.pl

INSTYTUT
„Pomnik - Centrum Zdrowia Dziecka
ZAKŁAD PATOMORFOLOGII
04-730 Warszawa, Al. Dzieci Polskich 20
tel.: 22 815 19 60; fax 22 815 19 75
Regon: 000557961; NIP: 952 11 43 675
I/ŻPA



Warszawa, 02.08.2022

Ocena rozprawy doktorskiej mgr Anety Moskalik

pt.: „Fenotyp makrofagów serca myszy w zespole metabolicznym oraz oddziaływanie makrofagów na komórki śródbłonka naczyń chłonnych in vitro”

Rozwój cywilizacyjny przyniósł ogromny postęp w nauce i technice oraz znaczną poprawę warunków życia ludzi, ale stał się jednocześnie przyczyną pojawienia się wielu nieznanych wcześniej zagrożeń. Jednym z nich jest zespół metaboliczny charakteryzujący się współwystępowaniem powiązanych ze sobą czynników ryzyka pochodzenia metabolicznego (otyłości, insulinooporności, dyslipidemii, hipercholesterolemii), sprzyjających rozwojowi chorób sercowo-naczyniowych o podłożu miażdżycowym oraz cukrzycy typu 2. Dostępne dane epidemiologiczne dotyczące rozpowszechnienia zespołu metabolicznego nie są optymistyczne. Zespół ten dotyczy około 20% dorosłych Polaków, a częstość jego występowania ciągle wzrasta przybierając formę epidemii. Nie dziwi więc fakt, że wielu badaczy zajmuje się patogenezą zespołu metabolicznego oraz metodami jego profilaktyki i leczenia, i chociaż czynniki predysponujące do zespołu metabolicznego są dosyć dobrze poznane, to jednak patomechanizm nie jest do końca zbadany. Dlatego uważam, że temat pracy doktorskiej Pani mgr Anety Moskalik oraz problemy badawcze w niej zawarte są niezmiernie ważne i aktualne, tym bardziej, że Doktorantka wspólnie z Panią Promotor prof. dr hab. Anną Ratajską decydując się na ocenę znaczenia makrofagów i komórek śródbłonka naczyń chłonnych serca w zespole metabolicznym wkroczyły na drogę poszukiwania nowych patomechanizmów mogących odgrywać rolę w rozwoju niewydolności serca. Nie do przecenienia jest fakt, że praca pochodzi z ośrodka badawczego, który jest wiodący nie tylko w Polsce, ale myślę, że na świecie w zakresie badań strukturalnych serca.

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska stanowi manuskrypt i składa się z typowych dla tego rodzaju prac 6 rozdziałów zawartych na 92 stronach starannie przygotowanego tekstu, streszczenia pracy w języku polskim i angielskim, spisu rycin, tabel i wykazu skrótów. Dołączono również Uchwałę I Lokalnej Komisji Etycznej do spraw doświadczeń na zwierzętach w Warszawie wyrażającej zgodę na przeprowadzenie badań eksperymentalnych.





We wstępie Doktorantka na 18 stronach przeglądu piśmiennictwa przedstawia najnowsze badania oraz w sposób wieloaspektowy analizuje dane dotyczące zespołu metabolicznego, ze szczególnym uwzględnieniem przebudowy serca w tym zespole oraz znaczenia naczyń chłonnych w sercu. W przeglądzie literatury Doktorantka poświęca podrozdział makrofagom sercowym, opisuje ich fenotyp zarówno w warunkach homeostazy, jak i w zaburzeniach metabolicznych i czynnościowych oraz wpływ makrofagów na naczynia chłonne i komórki śródbłonka naczyń chłonnych. Wstęp kończy podrozdział opisujący mikroRNA – niekodujące cząsteczki RNA, których znaczenie w zespole metabolicznym zostało opisane w ostatnich latach, ze szczególnym uwzględnieniem miRNA-31 – cząsteczki potencjalnie odgrywającej ważną rolę w progresji chorób sercowo-naczyniowych, co wykazał zespół prof. Anny Ratajskiej. Dogłębna analiza tematu skutkuje liczebnością piśmiennictwa, które zawiera ponad 198 pozycji.

Następstwem przeglądu piśmiennictwa są założenia i wyznaczony przez Doktorantkę cel rozprawy doktorskiej. W tej części Doktorantka w szczegółowy sposób opisuje motywy podjęcia tematu. Chciałabym podkreślić, że Doktorantka docenia znaczenie wcześniejszych wyników badań uzyskanych przez zespół badawczy kierowany przez Promotora prof. Annę Ratajską. Założenia jej rozprawy są więc logiczną konsekwencją pracy zespołowej, co uważam, że niezmiernie ważny aspekt w nauce. Doktorantka założyła, że „makrofagi za pośrednictwem miRNA-31 mogą wpływać na procesy związane z przebudową naczyń chłonnych oraz włóknieniem miokardium w zespole metabolicznym (myszy db/db)”. W celu przetestowania tego założenia sprawdziła wpływ makrofagów uzyskanych od eksperymentalnych myszy db/db zmodyfikowanych miRNA-31 na fenotyp komórek śródbłonka naczyń chłonnych w warunkach *in vitro*. W tej części pracy zabrakowało mi jednoznacznie postawionego celu głównego (prawdopodobnie Doktorantka uważała, że zawarty jest on w założeniach), tym bardziej, że szczegółowo wypunktowała cele szczegółowe (charakterystykę myszy db/db jako zwierzęcego modelu zespołu metabolicznego; zbadanie liczebności oraz fenotypu makrofagów serca myszy db/db; ocenę wpływu makrofagów modyfikowanych miR-31 na komórki śródbłonka naczyń chłonnych *in vitro*; ocenę fenotypu komórek śródbłonka naczyń chłonnych transfekowanych miR-31 *in vitro*), przy czym w streszczeniu część z nich zostało przedstawionych jako cel główny, np. ocena fenotypu makrofagów serca.

Materiały użyte do badań oraz metody badawcze Doktorantka dokładnie opisała w rozdziale III. Chciałabym podkreślić, że metody badawcze, które zostały wykorzystane przez Doktorantkę obejmują najnowocześniejsze techniki, począwszy od izolacji makrofagów z serc eksperymentalnych myszy w celu oceny ekspresji molekuł techniką cytometrii przepływowej poprzez ocenę fenotypu makrofagów *in vivo* w sercu metodą mikroskopii konfokalnej. Do badań *in vitro* Doktorantka użyła dwie linie komórkowe: linię makrofagów myszy RAW 264.7





(American Type Culture Collection - ATCC) oraz linię pierwotnych komórek śródbłonka naczyń chłonnych myszy C57BL/6, które były transfekowane miRNA-31. Dodatkowo supernatant z transfekowanych makrofagów RAW 264.7 został wykorzystany do stymulacji komórek śródbłonka. Efekt transfekcji – wytwarzanie czynników odpowiedzialnych za zmiany strukturalne serca, był oceniany zarówno na poziomie białka (technika ELISA), jak i na poziomie ekspresji genów przy pomocy qRT-PCR. Doktorantka oceniała również ekspresję białek w sercu myszy przy pomocy techniki Western-blot i qRT-PCR. Doświadczenia były starannie zaplanowane, zawsze z odpowiednimi i licznymi kontrolami. Mnie osobiście zabrakowało w tej części przedstawienia schematu przeprowadzonych badań eksperymentalnych. Myślę, że przedstawienie graficzne wykorzystanej metodologii byłoby bardzo przydatne. Uzyskane wyniki badań zostały poddane analizie statystycznej w przypadku rozkładu parametrycznego testem t-Studenta, natomiast gdy rozkład był nieparametryczny analizę wykonano testem Mann-Whitney'a. Wyniki uznano za istotne statystycznie, gdy wartość $p \leq 0,05$.

Wyniki przeprowadzonego eksperymentu Doktorantka opisała w rozdziale IV. Są one w przejrzysty sposób zilustrowane 18 rycinami. Wyniki pokazały, że wybrany model eksperymentalny myszy db/db posiada cechy zespołu metabolicznego, że makrofagi występują mniej licznie niż u myszy kontrolnych, i że ich fenotyp jest zróżnicowany. Najliczniejszą populację u myszy eksperymentalnych stanowiły makrofagi wykazujące ekspresję markerów o profilu przeciwzapalnym, charakteryzujące się wysoką ekspresją miRNA-31. Mniejszą liczebnie populację stanowiły makrofagi CD45+CD11b+CD64+Ly6C+/hi o fenotypie prozapalnym. Badania *in vitro* pokazały, że makrofagi pod wpływem miRNA-31 mogą hamować limfangiogenezę oraz prowadzić do zmian strukturalnych i funkcjonalnych komórek śródbłonka naczyń chłonnych. Makrofagi transfekowane mi-RNA-31 wykazywały również potencjał związany z hamowaniem procesów włóknienia.

W rozdziale IV Doktorantka przeprowadziła dyskusję uzyskanych wyników. Ten rozdział podzielony jest na podrozdziały punktuje główne zagadnienia (w zasadzie wnioski) wynikające z uzyskanych wyników, co uważam za bardzo kompetentnie przeprowadzoną dyskusję. Opis wyników badań oraz ich dyskusja świadczy o dogłębnej znajomości problemów badawczych, umiejętności logicznego wykorzystania piśmiennictwa, krytycznego podejścia do danych literaturowych i własnych oraz dowodzi dojrzałości naukowej Doktorantki.

Rozprawę doktorską kończy podsumowanie i wnioski. Do tej części pracy mam najwięcej zastrzeżeń. Nie wiem do czego odnosi się słowo „podsumowanie” – podsumowanie wyników? Mnie osobiście zabrakowało właśnie podsumowania wyników uzyskanych przez Doktorantkę. Uważam też, że część wniosków to opis zjawisk - wyników (np. wniosek 2).





Przedstawione podsumowanie i wnioski w zasadzie odnoszą się do celów szczegółowych, możliwe, że brak opisu celu głównego przyczynił się do niejednoznacznego wnioskowania. Oczywiście chciałabym podkreślić, że ta krytyczna uwaga nie umniejsza znaczenia uzyskanych wyników badań. Uważam, że uzyskane wyniki badań są nowatorskie i na pewno wkrótce będą opublikowane w renomowanych czasopiśmie naukowych. Do chwili obecnej nie badano tak szczegółowo makrofagów w zespole metabolicznym – Doktorantka jako pierwsza oceniła fenotyp makrofagów serca myszy w modelu eksperymentalnym i przedstawiła nowatorskie spojrzenie na potencjalny wpływ makrofagów na komórki śródbłonka naczyń chłonnych za pośrednictwem miRNA-31 w odniesieniu do przebudowy miokardium w zespole metabolicznym.

W podsumowaniu swojej recenzji chciałabym podkreślić wysoką wartość naukową rozprawy doktorskiej, wnoszącej znaczący wkład w zrozumienie znaczenia makrofagów w zespole metabolicznym. Kompleksowa, opierająca się na różnorodnych metodach i technikach badawczych analiza w pełni spełnia warunki rozprawy doktorskiej 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 późn.zm.) w związku z art. 179 ust. 1 ustawy z dnia 3 lipca 2018r. (przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce Dz.U. z 2018r. poz. 1669 z późn.zm.).

Kieruję zatem wniosek do Rady Dyscypliny Nauk Medycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie mgr Anety Moskalik do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie ze względu na nowatorskie badania, szerokowachlarzowe innowacyjne analizy oraz opublikowanie w postaci pracy poglądowej (jako pierwszy autor) w czasopiśmie Heart Fail Rev (2022 Jul;27(4):1413-1430) o wskaźniku „impact factor 4,654” części założeń pracy, wnoszę o wyróżnienie rozprawy doktorskiej.

KIEROWNIK
Pracowni Immunologii

prof. dr hab. med.
Bożena Cukrowska

Prof. dr hab. n. med. Bożena Cukrowska

