

**HIRSFELD INSTITUTE OF IMMUNOLOGY
AND EXPERIMENTAL THERAPY,
POLISH ACADEMY OF SCIENCES**

Centre of Excellence: IMMUNE

Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław, POLANDPhone: (+48-71) 337 11 72, (+48-71) 370 99 30 Fax: (+48-71) 337 21 71
www.hirsfeld.pl

BIURO RADY DYSCYPLINY NAUKI MEDYCZNE	
wpl. dnia	03-11-2024
L. dz. RN-BM/	1608

Zakład Immunologii Chorób Zakaźnych
Laboratorium Mikrobiologii LekarskiejWrocław, 04.11.2024
Wola 6.11.2024
Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu
RADA DYSCYPLINY NAUKI MEDYCZNE
M. Podhorska-Okołów
dr hab. Marzenna Podhorska-Okołów**RECENZJA**

rozprawy doktorskiej Pani mgr Urszuli Jakobsche-Policht pt.: "Analiza ekspresji receptora PAR-1 w płytkach krwi oraz wybranych polimorfizmów genu PAR-1 u pacjentów z miażdżycą zarostową"

Przedstawiona do recenzji praca doktorska Pani mgr Urszuli Jakobsche-Policht została wykonana pod kierunkiem Pani dr hab., prof. UMW Katarzyny Madziarskiej w Katedrze i Klinice Diabetologii i Chorób Wewnętrznych Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu. Badania w przedstawionej pracy dotyczą Receptora Aktywowanego Proteolitycznie -1 (PAR-1) obecnego na powierzchni płytek krwi (PLT), którego aktywacja inicjuje interakcję PLT ze śródbłonkiem w naczyniach krwionośnych i jest to etap uznawany za kluczowy w procesie rozwoju miażdżycy, co czyni go także istotnym celem terapeutycznym i diagnostycznym. Miażdżycę zaliczana jest do chorób cywilizacyjnych XXI wieku i stanowi globalny i wciąż narastający problem zdrowotny. Jest to wieloaspektowa jednostka chorobowa skupiająca uwagę naukowców głównie w obszarze zagadnień dotyczących poznawania mechanizmów molekularnych zaangażowanych w jej przebieg, w tym aktywacji genów i mutacji, a także roli komórek i czynników prozapalnych. W związku z powyższym uważam, że badania przedstawione w niniejszej pracy doktorskiej są bardzo cennym wkładem naukowym w zakresie nauk medycznych, które mogą przyczynić się do zrozumienia procesów patofizjologicznych w tej jednostce chorobowej i skutkować ulepszeniem diagnostyki oraz strategii leczenia pacjentów.

Przedstawiona do oceny dysertacja jest opracowaniem składającym się z trzynastu rozdziałów i liczy w sumie sto czterdzieści jeden stron. Monografia podzielona jest według standardowych norm przyjętych dla prac naukowych. Pracę rozpoczyna wstęp, a następnie przedstawione są cele pracy i dalej, jest część główna, która zawiera szczegółowy opis materiałów i metod użytych w badaniach, wyniki, dyskusję oraz wnioski. W dalszej części opracowania jest streszczenie w j. polskim i j. angielskim, wykaz piśmiennictwa liczącego dwieście trzydzieści dziewięć przypisów literaturowych, wykaz skrótów, spis rycin i tabeli. Na końcu dysertacji znajduje się „Dodatek” oraz osiągnięcia naukowe Doktorantki.

We „Wstępie” liczącym dwadzieścia pięć stron Autorka wprowadza czytelnika w zagadnienie dotyczące miażdżycy; jej przebiegu, obrazu klinicznego, metod diagnozowania oraz objawów. Następnie Doktorantka opisuje miażdżycę zarostową (MZ) oraz makroangiopatię cukrzycową (MC), wskazując na kryteria różnicujące MZ i MC, mechanizmy molekularne oraz czynniki istotne w przebiegu choroby, działania prewencyjne i ocenę ryzyka zgonu. Autorka w dalszej części „Wstępu” przechodzi do opisu hemostazy w przebiegu miażdżycy i roli płytek i mikropłytek krwi w tym procesie. Doktorantka następnie dokonuje szczegółowej charakterystyki receptorów płytkowych PAR-1; ich struktury, szlaków przekazywania sygnału, w których uczestniczą oraz ich genetycznego polimorfizmu. „Wstęp” posiada strukturę uporządkowaną, która wprowadza czytelnika z poziomu ogólnego do bardziej



HIRSZFELD INSTITUTE OF IMMUNOLOGY
AND EXPERIMENTAL THERAPY,
POLISH ACADEMY OF SCIENCES

Centre of Excellence: IMMUNE

Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław, POLAND

Phone: (+48-71) 337 11 72, (+48-71) 370 99 30 Fax: (+48-71) 337 21 71

www.hirsfeld.pl

szczegółowych zagadnień, w tym roli receptorów płytkowych PAR-1, które są tytułowym „bohaterem” niniejszej rozprawy. Rozdział ten jest zaopatrzony w dziewięć rycin oraz trzy tabele, a ponadto Autorka odsyła czytelnika do „Dodatku”, w którym czytelnik może uzupełnić brakujące informacje. Uważam, że jest to niezwykle pomysłowe rozwiązanie, ponieważ przy tak obszernej i wieloaspektowej tematyce poruszonej w niniejszej pracy „Dodatek” okazuje się niezwykle pomocny. Do tej części dysertacji mam jedną uwagę, a mianowicie w Tabeli 1.2: „Porównanie egzosomów i MP”, w komórce, w której powinny być wymienione białka, są także uwzględnione kwasy rybonukleinowe i deoksyrybonukleinowe, które do grupy białek nie należą.

Doktorantka w swojej pracy badawczej założyła, iż receptor PAR-1 obecny na PLT może odgrywać znaczącą rolę w rozwoju miażdżycy, podobnie jak i jego polimorfizm genetyczny. Ponadto Doktorantka zdecydowała się dokonać oceny roli PLT i MP w patofizjologii cukrzycy oraz miażdżycy. W związku z powyższym Autorka postawiła następujące cele: 1) ocena ekspresji powierzchniowego białka PAR-1 w płytkach krwi, 2) wykazanie wpływu polimorfizmów genetycznych PAR-1 na rozwój i rokowania w przebiegu w/w chorób, 3) analiza korelacji poziomu białka PAR-1 z metabolicznymi parametrami miażdżycy zarostowej oraz makroangiopatii cukrzycowej w grupach chorych, 4) ustalenie roli PAR-1 w procesie chorobowym, 5) ustalenie roli mikroplatek w patogenezie procesu miażdżycowego, 6) ustalenie przydatności cytometrycznego badania mikroplatek w diagnostyce chorób zakrzepowych. Doktorantka zaprezentowała w niniejszej rozprawie złożoność i wieloaspektowość podjętego tematu. W związku z powyższym w mojej ocenie zabrakło w tej części pracy klarownego doprecyzowania tezy badawczej i zasadności podjętych badań, w szczególności wskazania, do rozwiązania jakich problemów wyniki z realizacji powyższych celów mogą być przydatne.

Rozdział „Materiały i Metody” zawiera siedem podrozdziałów i dotyczy: kryteriów i standardowej metodologii diagnozowania pacjentów pod kątem MZ oraz MC, instrumentalnej metodologii diagnostycznej i badawczej z zastosowaniem cytometrii przepływowej, metod mikroskopowych, biochemicznych, immunoenzymatycznych, metod molekularnych oraz analizy statystycznej. Metody wykorzystane do przeprowadzenia badań opisanych w niniejszej pracy są w mojej ocenie adekwatne do weryfikacji postawionych założeń. Do tego rozdziału mam jedną uwagę, a mianowicie opis metody „Obrazowania mikroplatek w cytometrii przepływowej” jest niekompletny. Brakuje danych dotyczących użytych odczynników, nazwy producenta sprzętu oraz oprogramowania użytego do analizy.

W rozdziale: „Wyniki i ich omówienie” jest sześć podrozdziałów, z których dwa dotyczą oceny poziomu aktywacji receptora PAR-1 i oceny polimorfizmu genu kodującego to białko. Kolejne dwa rozdziały opisują wyniki eksperymentów agregacji mikroplatek i płytek krwi oraz oceny ilościowej wybranych czynników hemostazy i stanu zapalnego u pacjentów z MZ i MC. Pierwszy i ostatni podrozdział dotyczy analizy porównawczej między MZ i MC pod kątem antropometrycznym, laboratoryjnym, klinicznym oraz związku zmiennych z szansą występowania miażdżycy – wśród chorych na jedną ze wspomnianych chorób. Doktorantka uzyskała wyniki wskazujące, iż białko PAR-1 po aktywacji agonistą trombiny ulega zwiększonej ekspresji szczególnie w grupie osób chorujących na MC, co sugeruje jego udział w patomechanizmie (zwiększenie tworzenia się zakrzepów) prowadzącym do rozwoju miażdżycy na tle angiopatii miażdżycowej. Do określenia ekspresji białka PAR-1 Doktorantka



HIRSZFELD INSTITUTE OF IMMUNOLOGY
AND EXPERIMENTAL THERAPY,
POLISH ACADEMY OF SCIENCES

Centre of Excellence: IMMUNE

Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław, POLAND

Phone: (+48-71) 337 11 72, (+48-71) 370 99 30 Fax: (+48-71) 337 21 71

www.hirsfeld.pl

użyła także metody pomiaru ilości mRNA kodującego to białko, w której wykazała brak różnic istotnych statystycznie w badanych grupach pacjentów z MZ, MC i kontrolnej. Doktorantka użyła stwierdzenia, iż: „Otrzymane wartości nie korelowały również ani z liczbą receptorów PAR-1 ani z polimorfizmami”. Moje pytanie do tego stwierdzenia brzmi: **W jaki sposób określono korelację mRNA do białka PAR-1 i jaki jest wniosek z braku tej korelacji? Czy określenie poziomu mRNA dokonano po stymulacji agonistą trombiny, czy w nieaktywowanych płytkach krwi?**

W dalszej części tego rozdziału Autorka przedstawia wyniki badań, w których określone są mutacje w genie kodującym białko PAR-1 możliwie predysponujące ten receptor do wzmożonej ekspresji w wyniku aktywacji substytutem trombiny. W każdej grupie badanej analizowane są trzy polimorfizmy genu i dokonana jest analiza statystyczna różnic między grupami MZ, MC, a kontrolą. Doktorantka wykazała, iż u pacjentów z MC występują dwie mutacje, które mogą mieć wpływ na wzmożoną ekspresję PAR-1 po jego wcześniejszej aktywacji. Dalsze wyniki dotyczą roli mikroplatek krwi w rozwoju miażdżycy i możliwości użycia ich do celów diagnostycznych. Doktorantka przedstawiła swój autorski pomysł wykazania roli MP w rozwoju miażdżycy po jego wcześniejszej aktywacji przez agonistę trombiny. Na podstawie przeprowadzonych badań Autorka stwierdziła, iż aktywowanie mikroplatek może być użyteczną metodą w różnicowaniu grupy pacjentów z miażdżycą zarostową od grupy pacjentów z makroangiopatią cukrzycową, co jednak wymaga dalszego potwierdzenia na większej grupie badanych. Kolejne wyniki badań przedstawiają próbę określenia związku pomiędzy poziomem zaktywowanych PAR-1 a stężeniami czynników hemostazy i stanu zapalnego, których wzmożone działanie może być wynikiem toczących się patomechanizmów aterogennych. Doktorantka wykazała istotnie statystycznie niższe stężenia vWF w grupie pacjentów z MZ w porównaniu do grupy pacjentów z MC, co w skutkuje wolniejszym przebiegiem procesów zapalnych i prowadzących do rozwoju miażdżycy.

Rozdział „Wyniki i ich omówienie” kończy zaawansowana analiza statystyczna dotycząca różnic pomiędzy MZ, a MC w oparciu o związek zmiennych z szansą występowania miażdżycy wśród chorych na jedną ze wspomnianych chorób. Cały rozdział liczy ogółem 14 rycin i 4 tabele, przy czym Autorka wprowadziła podwójny sposób numeracji rycin. Moją sugestią jest, by numerację ujednolicić. Ponadto w tej części dysertacji mikroplatek są oznaczane skrótem PMP, podczas gdy wcześniej oznaczane były jako MP. Według wykazu skrótów zaś, PMP oznacza: *mikrocząsteczki pochodzące z mikroplatek*. Moją uwagę zwróciła także ogromna ilość danych, szczególnie dotyczących analizy statystycznej, w której uwzględniono niemalże wszystkie biochemiczne czynniki progresji miażdżycy. W tak ogromnej ilości danych łatwo utracić przewodni wątek podjętych badań. Ponadto tytuł pracy jest z tego powodu nieadekwatny do jej zawartości, ponieważ tytuł sugeruje, iż praca dotyczy głównie płytkowego białka PAR-1 w kontekście miażdżycy zarostowej. Niniejsza praca doktora dużo bardziej poszerza tematykę badawczą niż wskazuje na to jej tytuł. Nie zmienia to jednak faktu, że zaprezentowane wyniki posiadają dużą wartość poznawczą i naukową. Stwierdzam również, iż Doktorantka w wyniku przeprowadzonych badań osiągnęła postawione cele zawarte w niniejszej dysertacji, choć wyłuskanie ich z tak ogromnej ilości danych było trudnym zadaniem. **Dodatkowo mam jeszcze pytanie, które dotyczy analiz statystycznych, w których uwzględniana była płeć; jakie są ogólne wnioski otrzymane w wyniku tych analiz?**



HIRSZFELD INSTITUTE OF IMMUNOLOGY
AND EXPERIMENTAL THERAPY,
POLISH ACADEMY OF SCIENCES

Centre of Excellence: IMMUNE

Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław, POLAND

Phone: (+48-71) 337 11 72, (+48-71) 370 99 30 Fax: (+48-71) 337 21 71

www.hirsfeld.pl

„Dyskusję” rozpoczyna uzasadnienie podjętych badań, które miały na celu usprawnienie diagnostyki z jednoczesnym rozróżnieniem między miażdżycą zatorową, a angiopatią cukrzycową, co ma skutkować w doborze lepszej strategii prewencyjnej w rozwoju miażdżycy. Doktorantka kolejno, bardzo skrupulatnie omawia uzyskane wyniki w odniesieniu do badań opisanych w literaturze naukowej. Autorka dokonała stwierdzenia, iż istnieje możliwość wczesnego rozpoznania pomiędzy MZ, a MC z wykorzystaniem metodologii zastosowanej w niniejszych badaniach. Doktorantka wykazała również, iż interakcja płytkowych PAR-1 i trombiny może pełnić istotną rolę w inicjacji i rozwoju miażdżycy na tle makroangiopatii cukrzycowej. Stwierdzenie to jest niezmiernie istotne, gdyż testowane są obecnie rozwiązania hamowania rozwoju miażdżycy, w których celem terapeutycznym jest białko PAR-1. Oznacza to, że leki hamujące interakcję PAR-1/trombina będą mogły być wprowadzane do farmakoterapii na wczesnych etapach makroangiopatii cukrzycowej. Wymaga to jednak przeprowadzenia dalszych badań, które to potwierdzą. Doktorantka wykazała wpływ mutacji na wzmożoną ekspresję PAR-1 po jego wcześniejszej aktywacji oraz określiła rolę mikroplatek krwi w rozwoju miażdżycy i oceniła możliwość użycia ich do celów diagnostycznych.

Do tej części pracy mam parę uwag. Na stronie 78 Doktorantka definiuje epitopy, określając je jako białka. Epitopy to fragmenty białek, kilku-, kilkunasto-aminokwasowe sekwencje będące częścią białka. Na stronie 79 Autorka nazywa peptydyny strukturami, co jest błędem, ponieważ to są peptydy (struktury jako związki chemiczne nie istnieją). Ponadto mam uwagę do odnośników literaturowych, szczególnie tych opisujących białko PAR-1. Najnowsza cytowana praca pochodzi z roku 2017, pozostałe publikacje są sprzed i powyżej dziesięciu lat. Powoduje to, że pojawia się co najmniej siedmioletnia luka wiedzy dotycząca „głównego bohatera” niniejszej dysertacji. Warto zaktualizować te dane w przyszłości, gdy Doktorantka zdecyduje się opublikować swoje wyniki.

Końcowe wnioski przedstawiono w 6 punktach. W mojej ocenie nie wszystkie są konkluzją wyciągniętą na podstawie wyników badań, a jedynie podsumowaniem lub obserwacją uzyskanych wyników. Stanowią one jednak wartościowe zakończenie niniejszej dysertacji. Według mojej oceny zabrakło również stwierdzenia odnośnie powodzenia lub jego braku w realizacji postawionych przez Autorkę celów. Tym bardziej, że w „Streszczeniu” Doktorantka definiuje cele inaczej niż w części pod tytułem: „Cel pracy”. Jest to dość poważne niedopatrzenie mające swoje konsekwencje. Na przykład w „Celu pracy” jest zdefiniowany cel jak poniżej: „Analiza korelacji poziomu białka PAR-1 z metabolicznymi parametrami miażdżycy zarostowej oraz makroangiopatii cukrzycowej w grupach chorych”, a w „Streszczeniu” zaś jest – „Określenie zależności pomiędzy stężeniem PAR-1, a wartościami wybranych parametrów antropometrycznych, metabolicznych, klinicznych oraz hemostazy i stanu zapalnego”. W związku z tym niedopatrzeniem w pracy pojawiają się wyniki z oceny antropometrycznych parametrów, przy braku opisu odpowiedniej metodologii. Rozbieżność sformułowanych celów wpływa również na poprawność wnioskowania.

Praca jest niezwykle starannie napisana. Zdarzają się bardzo drobne błędy edytorskie, np, na stronie 73 zamiast „celi terapeutycznych”, powinno być „celów terapeutycznych”. Na stronie 78 zamiast „jednym z cel”, powinno być „jednym z celów”. Błędy te nie mają wpływu na wartość merytoryczną dysertacji. Nadmieniam o nich ze względu na swój obowiązek jako recenzentki pracy.



**HIRSFELD INSTITUTE OF IMMUNOLOGY
AND EXPERIMENTAL THERAPY,
POLISH ACADEMY OF SCIENCES**

Centre of Excellence: IMMUNE

Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław, POLAND

Phone: (+48-71) 337 11 72, (+48-71) 370 99 30 Fax: (+48-71) 337 21 71

www.hirsfeld.pl

Podsumowując, rozprawa doktorska Pani magister Urszuli Jakobsche-Policht znacznie wybiega poza ramy ujęte w tytule doktoratu. Cele pracy różnią się w początkowej i końcowej części dysertacji, co uważam za główny zarzut niniejszego opracowania. Jednakże należy docenić, iż Doktorantka część merytoryczną wieloaspektowego zagadnienia miażdżycy przedstawiła w sposób niezwykle skrupulatny i jednocześnie bardzo zrozumiały dla czytelnika. Badania ujęte w dysertacji uważam za bardzo ważne, a uzyskane wyniki w mojej ocenie posiadają dużą wartość naukową i praktyczną oraz stanowią podstawę do dalszych badań i dyskusji w zakresie diagnozowania i strategii leczenia pacjentów z MC i MZ i hamowania rozwoju miażdżycy. W związku z powyższym moja ocena doktoratu Pani magister Urszuli Jakobsche-Policht jest pozytywna. Rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 13 ust. 1 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.). Na podkreślenie zasługuje również niezwykle pokaźny dorobek naukowy Doktorantki, która jest współautorką 12 publikacji naukowych (o sumarycznym wskaźniku Impact Factor równym 21,127, indeksie Hirsza = 5). W związku z powyższym pozwalam sobie przedstawić Radzie Dyscypliny Nauki Medyczne Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu wniosek o dopuszczenie Pani magister Urszuli Jakobsche-Policht do dalszych etapów postępowania doktorskiego.

Z poważaniem



PODPIS ZAUFANY

EWA

BRZozowska

04.11.2024 17:28:55 [GMT+1]

Dokument podpisany elektronicznie
podpisem zaufanym