



Dr hab.n.med. Joanna Stępniewska
Kl. Nefrologii, Transplantologii i Chorób Wewnętrznych
Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie

Szczecin, 28.11.2024r.

***Recenzja osiągnięcia naukowego mgr Magdaleny Anny Król- Kulikowskiej,
pt. „Znaczenie wybranych polimorfizmów genów syntaz tlenku azotu (NOS) oraz genu
kodującego enzym konwertujący angiotensynę (ACE) w ocenie ryzyka wystąpienia
cukrzycowej choroby nerek”.***

Szacuje się, że w Polsce około 3 mln osób choruje na cukrzycę. Zarówno liczba przypadków, jak i częstość występowania wykazują tendencję wzrostową w ciągu ostatnich kilku dekad. Z uwagi na powszechność rozpoznawania, cukrzyca uznawana jest za chorobę społeczną i cywilizacyjną obok nadciśnienia tętniczego, miażdżycy czy przewlekłej choroby nerek, z którymi jest ściśle powiązana. Cukrzycowa choroba nerek należy do najczęstszych przyczyn schyłkowej niewydolności nerek wymagających dializ lub przeszczepienia nerki i stanowi 30-50% populacji chorych leczonych nerkozastępczo na całym świecie. Patofizjologia cukrzycowej choroby nerek nie jest do końca poznana ze względu na swój wieloczynnikowy i złożony charakter, co utrudnia profilaktykę i leczenie. Główną rolę odgrywa w niej utrzymująca się hiperglikemia, która inicjuje szlaki metaboliczne prowadzące do powstawania zaawansowanych produktów glikacji (AGEs), jak również reaktywnych form tlenu i azotu, czego efektem jest zjawisko stresu oksydacyjnego i nitrozacyjnego. Syntaza tlenku azotu (NOS) i enzym konwertujący angiotensynę (ACE) odgrywają istotną rolę w funkcjonowaniu układu krążenia. Tlenek azotu (NO) rozszerza naczynia krwionośne obniżając ciśnienie krwi, wpływa na funkcjonowanie śródbłonna naczyniowego, poprawia przepływ krwi przez tkanki i narządy przyczyniając się do zmniejszenia insulinooporności. Brak równowagi między produkcją a zużyciem tlenku azotu przyspiesza rozwój powikłań sercowo-naczyniowych i nerkowych u osób z cukrzycą. Natomiast zwiększona aktywność konwertazy angiotensyny w cukrzycy poprzez skurcz naczyń i stymulację syntezy aldosteronu powoduje wzrost ciśnienia tętniczego krwi oraz nasila procesy zapalne z następującym po nich włóknieniem uszkadzającym nieodwracalnie tkanki i narządy.

Ten krótki wstęp pozwala wykazać, że dokonany przez Doktorantkę wybór problemu badawczego jest niezwykle trafny i ma duże walory nie tylko poznawcze, ale również

praktyczno- kliniczne. Blokada układu renina- angiotensyna- aldosteron jest podstawową terapią nefroprotekcijną w cukrzycowej chorobie nerek. Analiza skuteczności terapii popularnymi inhibitorami konwertazy angiotensyny (benazeprylem, enalaprylem, lizynoprylem, ramiprylem) w kontekście wpływu wybranych polimorfizmów genów ACE, stężenia tego enzymu we krwi i interakcji między jego dwiema domenami (domeną N i domeną C) ma unikatowy aspekt praktyczny. Również ocena wpływu wybranych polimorfizmów w genach syntaz tlenku azotu, ze szczególnym uwzględnieniem roli NOS1 w rozwoju cukrzycowej choroby nerek ma charakter nowatorski i uzasadnia dalsze badania w tym obszarze.

Dysertacja ma formę cyklu spójnych i powiązanych ze sobą prac omawiających rolę polimorfizmów genów trzech izoform syntaz tlenku azotu (NOS1, NOS2, NOS3) oraz enzymu konwertazy aniotensyny (ACE), a także związek badanych polimorfizmów z metabolizmem pierwiastków śladowych takich jak cynk i miedź, w patogenezie ryzyka cukrzycowej choroby nerek. Wszystkie publikacje mają typowy układ: wstęp, opis metodologii, wyniki, dyskusję i wnioski. Zostały zamieszczone w formacie czasopism. Cykl składa się z trzech prac: pierwszej przeglądowej oraz dwóch oryginalnych zawierających wyniki badań i wnioski realizujące cele dysertacji. We wszystkich pracach doktorantka jest pierwszym autorem. Zostały one opublikowane w języku angielskim i zamieszczone w czasopismach z listy filadelfijskiej o łącznym Impact Factor 15,208 i punktacji MNiSW 380 pkt. Sumaryczna liczba cytowań prac na czas przygotowywania recenzji wynosi 109.

1.**Król Magdalena**, Kepinska Marta: Human nitric oxide synthase- its functions, polymorphism, and inhibitors in the context of inflammation, diabetes and cardiovascular diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, vol. 22, nr 1, art. 56 [18 s.]

DOI: 10.3390/ijms22010056

IF=6,208; MNiSW= 140 pkt; liczba cytowań: 107

2.**Król-Kulikowska Magdalena**, Abramenko Nikita, Jakubek Milan, Banasik Mirosław, Kepinska Marta: The role of angiotensin-converting enzyme (ACE) polymorphisms in the risk of development and treatment of diabetic nephropathy. *Journal of Clinical Medicine*, 2024, vol. 13, nr 4, art.995 [17 s.], DOI: 10.3390/jcm13040995

IF=3,000; MNiSW= 140 pkt; liczba cytowań: 2

3. **Król-Kulikowska Magdalena, Banasik Mirosław, Kepinska Marta:** The effect of selected nitric oxide synthase polymorphism on the risk of developing diabetic nephropathy.

Antioxidants, 2024, vol. 13, nr 7, art. 838 [23 s.], DOI: 10.3390/antiox13070838

IF=6,000; MNiSW= 100 pkt; liczba cytowań: 0

Przedstawiona mi do oceny rozprawa posiada typową strukturę podziału treści. Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego poprzedzone są: streszczeniem w języku polskim i angielskim, wstępem, określeniem celów i założeń pracy, opisem zastosowanych materiałów i metod, omówieniem wyników i dyskusją w formie komentarza do publikacji monotematycznych, podsumowaniem i przedstawieniem wniosków oraz piśmiennictwem. Całość dopełnia wykaz publikacji i osiągnięć naukowych doktorantki.

Pierwsza z cyklu publikacji pt: *“Human nitric oxide synthase- its functions, polymorphism, and inhibitors in the context of inflammation, diabetes and cardiovascular diseases”* jest pracą przeglądową opisującą rolę poszczególnych izoform syntaz tlenu azotu w najczęstszych chorobach cywilizacyjnych ze szczególnym uwzględnieniem cukrzycy i jej powikłań. Doktorantka zwraca uwagę na rolę polimorfizmów genów wszystkich izoform tego enzymu w zaburzeniach przemian glukozy. Wykazując się dobrą znajomością przemian biochemicznych opisuje metabolizm tlenu azotu skupiając się na reakcjach wolnorodnikowych i stresie nitrozacyjnym. Aspektów praktyczno-klinicznych dotyczy rozdział pracy o postępach w badaniach nad selektywnymi inhibitorami NOS i ich potencjalnej przyszłej roli w terapii. Mimo trudnej tematyki, publikacja napisana jest zrozumiałym i rzeczowym językiem, uzupełniona tabelami i rycinami. W pracy cytowanych jest 147 pozycji piśmiennictwa, większość z ostatnich 15 lat, których dobór świadczy o prawidłowej umiejętności korzystania ze źródeł naukowych. Praca cytowana była 107 razy.

Druga publikacja jest artykułem oryginalnym, w którym ocenie zostały poddane dwa polimorfizmy w genie ACE – rs4343 i rs4646994 i ich znaczenie w rozwoju cukrzycowej choroby nerek i konieczności zastosowania terapii nerkozastępczej. Przeprowadzono również analizę *in silico* w celu porównania wiązania leków z grupy ACEi z dwiema domenami ACE- domeną N i domeną C oraz oznaczono stężenia pierwiastków śladowych takich jak miedź i cynk w surowicy. W badaniu uczestniczyło 225 osób, w tym grupa badana składała się z 81 pacjentów z cukrzycową chorobą nerek oraz 94 pacjentów z cukrzycową chorobą nerek będących po przeszczepieniu nerki. Grupę kontrolną stanowiło 50 zdrowych ochotników. Poszczególne grupy różniły się między sobą istotnie statystycznie pod względem

wieku i BMI, co mogłoby stanowić jeden z punktów dyskusji nie tylko odnośnie ryzyka wystąpienia cukrzycy i jej powikłań, jak również odnośnie otrzymanych stężeń i aktywności badanych enzymów. Konstrukcja badania i dobór metod badawczych jest prawidłowa. Doktorantka dowiodła, że polimorfizmy badanych genów nie wpływają na stężenie ACE. Używając modelu regresji logistycznej stwierdziła natomiast, że genotypy G/G i G/A oraz sam allel G polimorfizmu rs4343 w genie ACE związane były ze zwiększonym ryzykiem rozwoju cukrzycowej choroby nerek oraz konieczności terapii nerkozastępczej. Najbardziej obiecującym i praktycznym wnioskiem przeprowadzonego badania, jest stwierdzenie w analizie *in silico*, że polimorfizm genu rs4646994 ACE może warunkować skuteczność działania wybranych leków z grupy ACEi, co otwierałoby możliwość doboru leku również przy udziale kryteriów genetycznych. Ostatnim wnioskiem z badania jest wykazanie związku niedoboru cynku ze zwiększonym ryzykiem rozwoju cukrzycowej choroby nerek, co skłaniałoby do zaleceń suplementacji tego mikroelementu u chorych z cukrzycą.

Trzecia publikacja jest artykułem oryginalnym realizującym cel badawczy Doktorantki w postaci oceny, czy wybrane polimorfizmy genów trzech izoform syntazy tlenu azotu (NOS1, NOS2, NOS3) wpływają na stężenie i aktywność tych enzymów, a także na rozwój cukrzycowej choroby nerek i konieczność wprowadzenia terapii nerkozastępczej. W badaniu wzięły udział 232 osoby, podział na poszczególne grupy był analogiczny jak w pierwszym badaniu oryginalnym. Jako metod badawczych użyto PCR i PCR- RFLP. Wyniki badań, przedstawione w dysertacji dowodzą roli wszystkich izoform NOS w patogenezie i rozwoju cukrzycowej choroby nerek. Najbardziej podkreślaną w dotychczasowym piśmiennictwie była rola NOS3 (tzw. endotelialnej NOS), bezpośrednio związanej z regulacją funkcji naczyń krwionośnych. W omawianej pracy badawczej stwierdzono jednak związek polimorfizmów zarówno NOS1 (tzw. neuronalnej) i NOS2 (tzw. indukowalnej) izoformy enzymu z ryzykiem cukrzycowej choroby nerek, jak również wykazano szereg interesujących i ważnych z klinicznego punktu widzenia korelacji z wynikami podstawowych badań biochemicznych.

Wnioski przedstawione w dysertacji są prawidłowo sformułowane i odpowiadają celom i założeniom pracy. Dyskusja dowodzi dobrego przygotowania merytorycznego oraz znajomości aktualnych doniesień dotyczących badanego zagadnienia. Doktorantka wykazała się umiejętnością krytycznej oceny własnych wyników na tle cytowanego aktualnego piśmiennictwa i rozważnym wyciąganiem wniosków. Ogromną zaletą dysertacji jest literacki

język i niezwykle staranna strona edytorska maszynopisu. Przytoczone drobne uwagi nie umniejszają bardzo wysokiej oceny merytorycznej recenzowanej pracy.

Rozprawa doktorska, autorstwa Magdaleny Anny Król- Kulikowskiej spełnia warunki określone w art. 187 ust. 1 i 2 ustawy Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U.z 2018 r., poz. 1668 ze zm.). Wnoszę do Rady Dyscypliny Nauki Farmaceutyczne Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu o dopuszczenie rozprawy mgr Magdaleny Anny Król- Kulikowskiej do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia naukowego doktora.

Jednocześnie wnioskuję o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr Magdaleny Anny Król- Kulikowskiej. Uzasadnienie wyróżnienia:

1. Unikalny aspekt praktyczno- kliniczny dysertacji dotyczący oceny skuteczności leczenia popularnymi ACEi w oparciu o wybrane polimorfizmy genów ACE i związane z nimi różne interakcje leków z dwiema domenami ACE (domeną N i domeną C), co daje możliwość dodania kryterium genetycznego przy wyborze terapii cukrzycowej choroby nerek.
2. Wykazanie roli polimorfizmów genów wszystkich izoform syntazy tlenku azotu, ze szczególnym uwzględnieniem NOS1 i NOS2, co ma charakter nowatorski i może być wykorzystane do przewidywania ryzyka cukrzycowej choroby nerek, jej wczesnego wykrywania i efektywnego leczenia.