

RN - BF 4000.3.2020

Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu

RADY DYSCYPLINY NAUK FARMACEUTYCZNE

Podpis 04.12.2024



INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ

IM. LUDWIKA HIRSZFELDA

POLSKIEJ AKADEMII NAUK

Centrum Doskonałości : IMMUNE

Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław, POLSKA

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

www.hirsztfeld.pl

Dr hab. Agnieszka Zabłocka, prof. IITD
Zakład Mikrobiologii
Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej
Polskiej Akademii Nauk
We Wrocławiu

Wrocław, 29.11.2024

Recenzja rozprawy doktorskiej
mgr Magdaleny Anny Król – Kulikowskiej

Tytuł rozprawy: „**Znaczenie wybranych polimorfizmów genów syntaz tlenku azotu (*NOS*) oraz genu kodującego enzym konwertujący angiotensynę (*ACE*) w ocenie ryzyka wystąpienia cukrzycowej choroby nerek**”.

Promotor : dr hab. inż. Marta Kepinska, prof. UMW
Praca wykonana w Katedrze i Zakładzie Biochemii Farmaceutycznej
Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska to spójny cykl 3 publikacji wieloautorskich, w których mgr Magdalena Anna Król-Kulikowska jest pierwszą autorką. W skład cyklu wchodzi jedna praca przeglądowa opublikowana w 2021 roku w czasopiśmie o współczynniku wpływu 6,208 oraz dwie prace eksperymentalne, opublikowane w roku 2024 w czasopismach o współczynnikach wpływu 3,00 oraz 6,00. Wszystkie publikacje ukazały się w czasopismach umieszczonych na liście punktowanych czasopism MNiSW o łącznej wartości współczynnika wpływu 15,208.

Wkład Doktorantki w przedłożonych publikacjach jest wiodący i znaczący, co znalazło potwierdzenie w oświadczeniach współautorów, załączonych na końcu rozprawy. Z oświadczeń wynika, że Doktorantka wykonała większość eksperymentów, a także uczestniczyła w opracowaniu koncepcji badań, opracowaniu wyników, przeglądzie literatury, przygotowaniu manuskryptów oraz ich edycji. Opublikowanie przez Doktorantkę i współpracowników wyników badań w czasopismach w wysokim współczynniku wpływu świadczy o tym, że badania zostały dobrze zaplanowane i wykonane, a także pozytywnie ocenione przez recenzentów czasopism, w których się ukazały, nie budząc przy tym zastrzeżeń merytorycznych.

W tym miejscu chciałabym podkreślić, że mgr Magdalena Anna Król - Kulikowska jest młodym naukowcem posiadającym wyróżniający się dorobek naukowy, który obejmuje 10 publikacji, w tym 8 prac anglojęzycznych opublikowanych w czasopismach o wysokim współczynniku wpływu (w tym 3 prace wchodzące w skład cyklu), jedną pracę w wydawnictwie polskim oraz jedną pracę anglojęzyczną bez współczynnika wpływu. Jest współautorką 21 doniesień naukowych, brała również udział w realizacji sześciu projektów naukowych, w tym w jednym pełniła funkcję kierownika. Ponadto, Doktorantka jest laureatką



INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ
IM. LUDWIKA HIRSZFELDA
POLSKIEJ AKADEMII NAUK
Centrum Doskonałości : IMMUNE

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

trzech nagród i odbyła trzy staże naukowe w tym, w 2022 roku staż na Uniwersytecie Karola w Pradze oraz w 2024 roku staż na Międzynarodowym Uniwersytecie Greckim w Salonikach.

Cykl publikacji stanowiący rozprawę doktorską poprzedzony jest omówieniem pracy, składającym się z dwunastu rozdziałów, obejmujących m.in. streszczenie w języku polskim i angielskim, zwięzły wstęp przedstawiający aktualny stan wiedzy w wybranym obszarze badań, cel i szczegółowe założenia pracy, krótki opis stosowanych metod badawczych, wyników i dyskusję (które szczegółowo opisane zostały w pracach eksperymentalnych), podsumowanie uzyskanych osiągnięć oraz wnioski końcowe.

Tematyka podjęta w rozprawie doktorskiej jest niezwykle interesująca i odpowiada na istotną potrzebę uzupełnienia luk w wiedzy oraz doprecyzowania zagadnień w tym obszarze badawczym. Doktorantka skoncentrowała się na analizie wpływu polimorfizmów genów syntaz tlenu azotu (*NOS1*, *NOS2*, *NOS3*) oraz enzymu konwertującego angiotensynę (*ACE*) na ocenę ryzyka wystąpienia cukrzycowej choroby nerek - jednego z najpoważniejszych powikłań cukrzycy. Do czynników patogennych powiązanych z tą chorobą zalicza się m.in. tlenek azotu, produkowany przez syntazę tlenu azotu (*NOS*). Istotną rolę odgrywa także enzym konwertujący angiotensynę (*ACE*), odpowiedzialny za produkcję angiotensyny II. Mimo że wiele kwestii pozostaje niejasnych, coraz więcej dowodów wskazuje na istotną rolę czynników genetycznych, w tym polimorfizmów genów kodujących kluczowe białka i enzymy, takie jak *ACE* i *NOS*, w determinowaniu podatności na tę chorobę. Badanie polimorfizmu genu *NOS1* stanowi istotny element oryginalności tej pracy, ponieważ istnieje niewiele badań skupiających się na tym obszarze, co podkreśla jego potencjał do wniesienia nowych danych do literatury naukowej. Ponadto, biorąc pod uwagę istotny udział czynników etnicznych w predysponowaniu zachorowalności na tę chorobę, niezwykle ważne jest przeprowadzanie takich badań na polskiej populacji. Pogłębianie wiedzy na temat genetycznych podstaw cukrzycowej choroby nerek może odegrać kluczową rolę w doskonaleniu metod szybkiego diagnozowania pacjentów z cukrzycą, a także prowadzić do rozwoju spersonalizowanych strategii leczenia. Uwzględnienie indywidualnych predyspozycji genetycznych może nie tylko zwiększyć skuteczność profilaktyki, ale także zrewolucjonizować podejście do leczenia powikłań cukrzycowych.

Aby zrealizować cel pracy, Doktorantka precyzyjnie wyznaczyła pięć celów szczegółowych, które obejmowały: a) ocenę związku pomiędzy występowaniem określonego genotypu w badanych polimorfizmach w genie *ACE* oraz *NOS1*, *NOS2*, *NOS3* a rozwojem cukrzycowej choroby nerek oraz koniecznością wprowadzenia terapii nerkozastępczej; b) ocenę wpływu badanych polimorfizmów genów na stężenie/aktywność *ACE* oraz *NOS1*, *NOS2*, *NOS3*; c) ocenę wpływu badanych polimorfizmów genów na stężenie glukozy, kreatyniny, eGFR i CRP; d) ocenę wpływu badanych polimorfizmów genów na potencjalne zaburzenia metabolizmu cynku i miedzi, oraz e) zbadanie i porównanie interakcji pomiędzy dwiema domenami *ACE*, a wybranymi lekami z grupy inhibitorów *ACE* oraz analiza wpływu wybranych polimorfizmów *ACE* na skuteczność terapii inhibitorami *ACE*.

Cele, jakie wyznaczyła sobie Doktorantka zostały przez nią w pełni zrealizowane.



INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ
IM. LUDWIKA HIRSZFELDA
POLSKIEJ AKADEMII NAUK
Centrum Doskonałości : IMMUNE

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

Zarówno cel pracy, jak i jej założenia wynikają logicznie ze *Wstępu* umieszczonego na początku rozprawy doktorskiej oraz z pracy przeglądowej wchodzącej w skład cyklu. We *Wstępie*, przygotowanym na podstawie 54 pozycji literaturowych, Doktorantka przedstawiła w zwięzły sposób problematykę związaną z cukrzycową chorobą nerek, omówiła czynniki sprzyjające jej powstawaniu oraz jej patogenezę, opisała rolę poszczególnych izoform syntazy tlenu azotu (NOS1, NOS2 i NOS3) oraz enzymu konwertującego angiotensynę w organizmie człowieka, a także przedstawiła dane naukowe potwierdzające wpływ polimorfizmów genów kodujących te białka na rozwój i progresję cukrzycowej choroby nerek. Co istotne, Doktorantka podkreśliła fakt, że mimo obecności NOS1 w komórkach β trzustki brak jest wyników badań polimorfizmów w genie tego enzymu. Omówiono też bardzo krótko rolę enzymu konwertującego angiotensynę oraz wpływ polimorfizmu genu *ACE* na skuteczność leczenia inhibitorami ACE.

Praca przeglądowa opublikowana w *International Journal of Molecular Sciences* w sposób wyczerpujący przedstawia aktualny stan wiedzy na temat roli syntaz tlenu azotu oraz produkowanego przez nie tlenu azotu, podkreślając ich istotną rolę w procesach zapalnych i stanach patologicznych, takich jak otyłość, cukrzyca czy choroby serca. W pracy opisano również wpływ polimorfizmów genów kodujących poszczególne izoformy NOS na rozwój tych schorzeń. Szczególnie interesujący jest rozdział publikacji poświęcony inhibitorom NOS i ich roli w terapii. Warto zaznaczyć, że praca przeglądowa została przygotowana z dużą starannością i szczegółowością, w oparciu o analizę 147 pozycji literatury. Udział Doktorantki w przygotowaniu przedstawionej pracy przeglądowej, a także przegląd informacji przedstawiony w rozdziale *Wstęp*, świadczy o jej bardzo dobrym przygotowaniu teoretycznym do prowadzenia badań eksperymentalnych. Ponadto, opracowania części teoretycznych zawarte w pracach oryginalnych, będących częścią cyklu, uzupełniają wiedzę na temat roli, jaką ACE oraz NOS odgrywają w rozwoju cukrzycowej choroby nerek.

- W opinii Recenzentki, opis roli enzymu konwertującego angiotensynę znajdujący się w rozdziale *Wstęp* (punkt 3, podpunkt 3.1) zasługiwał na zdecydowanie większą uwagę.
- Ponieważ praca przeglądowa została opublikowana w 2021 roku chciałam zapytać, czy pojawiły się nowe doniesienia na temat potencjalnych możliwości modulowania aktywności NOS.

W drugiej i trzeciej pracy cyklu Autorka przedstawiła oryginalne wyniki przeprowadzonych badań naukowych. Elementem łączącym obie prace jest grupa badawcza stanowiąca 232 osoby. Na podstawie wywiadu lekarskiego, przeprowadzonych badań laboratoryjnych i obrazowych, kryteriów włączenia /wyłączenia oraz ankiety, Doktorantka przyporządkowała 85 osób do grupy pacjentów ze zdiagnozowaną cukrzycową chorobą nerek, 97 pacjentów do grupy ze zdiagnozowaną cukrzycową chorobą nerek i będących po przeszczepie nerki, oraz 50 osób do grupy kontrolnej. Materiał do badań stanowiły próbki surowicy, osocza oraz kożuch leukocyтарно-пłytkowy, pozyskane z krwi pełnej pacjentów. W badanym materiale oznaczono stężenie oraz aktywność ACE, stężenia izoform NOS, poziom glukozy, kreatyniny, CRP i eGFR, cynku oraz miedzi. Przeprowadzono również analizę wybranych polimorfizmów genów *ACE* oraz *NOS1*, *NOS2*, *NOS3*.



INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ
IM. LUDWIKA HIRSZFELDA
POLSKIEJ AKADEMII NAUK
Centrum Doskonałości : IMMUNE

Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław, POLSKA

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

www.hirszfeld.pl

W pierwszej pracy oryginalnej, opublikowanej w *Journal of Clinical Medicine*, Doktorantka przedstawiła wyniki analizy dwóch polimorfizmów genu *ACE*: rs4343 i rs4646994 przeprowadzonej pod kątem ich potencjalnej roli w rozwoju cukrzycowej choroby nerek oraz zwiększonego prawdopodobieństwa zastosowania terapii nerkozastępczej. Autorka wykazała, że badane polimorfizmy nie mają wpływu na stężenie ACE, zaobserwowała natomiast spadek aktywności tego enzymu u pacjentów z cukrzycową chorobą nerek i genotypem A/A polimorfizmu rs4343 w porównaniu do grupy kontrolnej. Z kolei, uzyskane wyniki regresji logistycznej wykazały zależność pomiędzy obecnością polimorfizmu rs4343, w szczególności genotypów G/G i G/A oraz allelu G, a zwiększonym ryzykiem rozwoju cukrzycowej choroby nerek lub zwiększonym prawdopodobieństwem konieczności leczenia nerkozastępczego. Wyniki te wskazują na potencjalne użycie polimorfizmów jako narzędzi diagnostycznych. Ciekawe były również spostrzeżenia dotyczące wpływu badanych polimorfizmów na zaburzenia metabolizmu cynku. Podobnych zależności nie wykazano dla drugiego badanego polimorfizmu rs4646994. Na szczególną uwagę zasługują wyniki uzyskane metodą analizy *in silico*. Autorka zaobserwowała występowanie zależności między skutecznością działania badanych leków należących do grupy inhibitorów ACE, a polimorfizmem rs4646994 w genie *ACE*, co może mieć istotny wpływ na skuteczność stosowanej terapii. Doktorantka podkreśliła, że kierowanie się kryterium genetycznym może znacząco wpływać na jej efektywność.

W drugiej pracy oryginalnej, opublikowanej w czasopiśmie *Antioxidants*, Doktorantka przedstawiła wyniki badań dotyczących oceny częstości występowania wybranych polimorfizmów genów kodujących trzy izoformy NOS - rs3782218 (*NOS1*), rs1137933 (*NOS2*), rs1799983, rs2070744 i rs61722009 (*NOS3*), u pacjentów z nefropatią cukrzycową po przeszczepieniu nerki oraz bez przeszczepu. Dodatkowo, Doktorantka zbadała zależność pomiędzy poszczególnymi genotypami badanych polimorfizmów a stężeniem poszczególnych izoform NOS, kreatyniny, białka C-reaktywnego, glukozy oraz stężeniem jonów cynku i miedzi.

Kluczowym osiągnięciem Autorki były wyniki badań uzyskane dla polimorfizmu rs3782218 w genie *NOS1*. Stosując analizę regresji logistycznej, Doktorantka wykazała, że obecność tego polimorfizmu, a w szczególności genotyp C/C mogą zwiększać ryzyko rozwoju cukrzycowej choroby nerek nawet dwunastokrotnie. Ponadto, allel C polimorfizmu rs3782218 w genie *NOS1* może zwiększać prawdopodobieństwo konieczności zastosowania terapii nerkozastępczej. Z kolei allel G polimorfizmu rs1137933 w genie *NOS2* może to ryzyko obniżyć nawet 3-krotnie. Autorka zaobserwowała również, że wiek jest istotnym czynnikiem zwiększającym ryzyko tych powikłań. Chociaż nie wykazano roli polimorfizmów genu *NOS3* w ryzyku rozwoju powikłań cukrzycy, niższe stężenie tego enzymu obserwowano u pacjentów z nefropatią cukrzycową lub po przeszczepie nerki.

Pytania do prac oryginalnych.

- W swojej pracy Doktorantka podkreśliła wpływ hiperglikemii na indukcję stresu nitrozacyjnego. Jakie dodatkowe parametry (np. biomarkery zapalne, oksydacyjne) warto uwzględnić w przyszłych badaniach, aby lepiej zrozumieć zależność pomiędzy wybranymi polimorfizmami genów *NOS*, stężeniami NOS a cukrzycową chorobą nerek?
- Czy niższe stężenie NOS3 obserwowane w grupie pacjentów z nefropatią cukrzycową można uznać za przyczynę, czy raczej konsekwencję postępujących uszkodzeń nerek?



INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ

IM. LUDWIKA HIRSZFELDA
POLSKIEJ AKADEMII NAUK

Centrum Doskonałości : IMMUNE

Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław, POLSKA

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

www.hirsztfeld.pl

- Jak Doktorantka wyjaśni, w kontekście produkcji tlenu azotu, mechanizm, w którym polimorfizm rs3782218 w genie *NOS1* zwiększa ryzyko rozwoju cukrzycowej choroby nerek, podczas gdy polimorfizm rs1137933 w genie *NOS2* obniża to ryzyko?

W trakcie realizacji prac eksperymentalnych doktorantka wykazała się znajomością nowoczesnych metod oraz technik wykorzystywanych w biologii molekularnej, jak również w analizach biochemicznych i immunologicznych. Do jej umiejętności należy m.in. przeprowadzanie testu ELISA, wykorzystanie techniki łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR), zastosowanie techniki PCR-RFLP (polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych) oraz dokowanie molekularne.

Ostatecznie wyniki badań, zaprezentowane w oryginalnych pracach cyklu, zostały przez Autorkę wnikliwie przeanalizowane, zwięźle podsumowane i ujęte w postaci trzech kluczowych wniosków. Podkreślono istotny naukowo charakter badań nad wpływem polimorfizmów genów *NOS* i *ACE* na rozwój powikłań cukrzycy, zwracając uwagę na ich wysoką wartość badawczą i zasadność kontynuowania dalszych analiz w tym obszarze.

Praca doktorska została napisana z zachowaniem poprawności językowej i przygotowana z należytą dbałością o kwestie formalne. Nieliczne uchybienia stylistyczne w wersji polskiej nie mają wpływu na jasność przekazu ani wysoką ocenę merytoryczną. Moje drobne uwagi dotyczą braku wyjaśnienia skrótu MDRD w języku polskim, umieszczonego w *Wykazie skrótów*, czy nieścisłości w tytule Ryciny 2, umieszczonego we *Wstępie* oraz *Wykazie rycin*. Unikałabym też stosowania nazwy „endotelialna NOS” - bardziej poprawna jest nazwa „śródbłonkowa NOS”.

W mojej ocenie zaprezentowany cykl publikacji, zespólny wstępem i podsumowaniem, spełnia wszystkie kryteria dobrze zaplanowanej i starannie wykonanej pracy naukowej. Doktorantka wykazała się gruntowną wiedzą teoretyczną, niezbędną do planowania i przeprowadzenia badań naukowych, a także umiejętnością precyzyjnego formułowania celu i założeń badawczych. Trafnie dobrała oraz zastosowała nowoczesne techniki eksperymentalne oraz wykazała się biegłością i krytycyzmem w analizie uzyskanych wyników badań. Uważam, że założony cel pracy został osiągnięty, a wyniki uzyskane w toku badań przedstawiono w sposób przejrzysty i logiczny. Wnioski sformułowano, podkreślając ich istotne znaczenie praktyczne. Uzyskane rezultaty stanowią ważny wkład w aktualny stan wiedzy i mogą mieć znaczące implikacje kliniczne, wskazując na potrzebę opracowania indywidualnych programów terapeutycznych precyzyjnie dostosowanych do potrzeb pacjentów. Bez wątplenia wyniki badań przeprowadzonych w ramach niniejszej pracy doktorskiej mogą stanowić solidną podstawę dla przyszłych badań w tym obszarze.



INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ
IM. LUDWIKA HIRSZFELDA
POLSKIEJ AKADEMII NAUK
Centrum Doskonałości : IMMUNE
Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław, POLSKA
Telefon: (+48-71) 337 11 72, (+48-71) 370 99 30 Fax: (+48-71) 337 21 71
www.hirsfeld.pl

W związku z powyższym stwierdzam, że rozprawa doktorska, autorstwa mgr 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.

Uwzględniając aktualność poruszanej tematyki badawczej oraz wysoką wartość naukową uzyskanych wyników wnoszę o jej wyróżnienie.

Agnieszka Zolotko