

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Agnieszka Olejnik,
pt. „Rola białka Klotho podczas uszkodzenia niedokrwiennie-reperfuzyjnego mięśnia
sercowego”, napisanej pod kierunkiem dr hab. n. farm. Iwona Bil-Lula (promotor) i
wykonanej w Katedrze Analityki Medycznej Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu**

Zachorowalność i śmiertelność z powodu chorób układu sercowo-naczyniowego na świecie ciągle wzrasta, dlatego też obecnie bardzo ważna jest profilaktyka powyższych chorób, a także wczesna ich diagnostyka i podjęcie skutecznego leczenia. Współczesna medycyna, a zwłaszcza kardiologia, nie osiągnie tych celów jeśli dokładnie nie zostaną poznane mechanizmy i następstwa uszkodzeń komórek mięśnia sercowego, a także czynniki biorących udział w tym procesie oraz czynniki o działaniu kardioprotekcyjnym. Jednym z takich czynników o działaniu kardioprotekcyjnym może być, badane w przedłożonej dysertacji, białko Klotho, którego ekspresję potwierdzono w wielu tkankach i narządach, w tym w tkance sercowej. Białko Klotho bierze udział w regulacji metabolizmu oraz zachowaniu równowagi jonowej organizmu, a zaobserwowano także znaczenie tego białka w zmniejszeniu stresu oksydacyjnego, stanu zapalnego i zmian włóknieniowych, a jego niedobór może być biomarkerem uszkodzenia nerek.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska nie jest opracowaniem o klasycznej strukturze, a zbiorem opublikowanych prac powiązanych tematycznie. Podczas przygotowywania pracy zachowano logiczną kolejność, w której praca pogładowa odpowiada części teoretycznej, a dwie publikacje oryginalne odzwierciedlają część badawczą rozprawy doktorskiej. W mojej ocenie, układ pracy jest przejrzysty i zgodny z wymaganiami dotyczącymi rozpraw doktorskich.

Dysertację rozpoczyna streszczenie w języku polskim i angielskim, gdzie Autorka w sposób bardzo klarowny i zrozumiały przedstawiła założenia, metodykę, uzyskane wyniki i

podsumowanie rozprawy doktorskiej. Według mnie samo streszczenie mogłoby być trochę krótsze (liczy prawie 4 strony) i skupić się na najważniejszych wynikach pracy. Aczkolwiek ze względu na mnogość uzyskanych danych rozumiem chęć Autorki do zaprezentowania wszystkich istotnych wyników rozprawy doktorskiej, które mają znaczenie diagnostyczne i naukowe.

We „Wstępie”, liczącym 10 stron, Doktorantka w sposób wyczerpujący wprowadza w temat rozprawy, bazując przede wszystkim na pracy pogładowej, pt. „*The Biological Role of Klotho Protein in the Development of Cardiovascular Diseases*”, wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej. Publikacja ta stanowi przegląd literatury, dotyczącej między innymi budowy białka Klotho, syntezy komórkowej i ekspresji tkankowej. Autorka bardzo dokładnie opisuje funkcje biologiczne białka Klotho, a także jego rolę w różnych stanach patologicznych, tj. między innymi w chorobach nerek, tkanki nerwowej, w chorobach nowotworowych, a zwłaszcza w chorobach układu sercowo-naczyniowego (CVD) oraz jego ekspresję tkankową w *myocardium*. Autorka przedstawia także mechanizm uszkodzenia niedokrwienno-reperfuzyjnego mięśnia sercowego (IRI), który może w konsekwencji prowadzić do zmian strukturalnych i funkcjonalnych serca oraz do śmierci kardiomiocytów, a dokładne poznanie tych mechanizmów, w mojej ocenie jest szczególnie ważne i jest przedmiotem badań współczesnej medycyny. Na wyróżnienie zasługuje fakt, iż Doktorantka kierowała się przeglądem fachowego i współczesnego piśmiennictwa (109 z 136, tj. 80% pozycji piśmiennictwa pracy pogładowej pochodzi z ostatnich 15. lat).

Głównym celem badań prezentowanej rozprawy doktorskiej była ocena roli białka Klotho i jego wpływu na mechanizmy kardioprotekcyjne w uszkodzeniach niedokrwienno-reperfuzyjnych serca (IRI) w badaniach *in vitro* i *ex vivo*. Autorka oceniała ekspresję białka Klotho w sercu na poziomie komórkowym i tkankowym, a także jego wykorzystanie jako markera uszkodzenia serca. Ponadto Autorka oceniała wpływ białka Klotho na żywotność,

aktywność metaboliczną i kurczliwość kardiomiocytów w badaniach *in vitro*, a także wpływ tego białka na stopień uszkodzenia, stres oksydacyjny i degradację białek kurczliwych serca w badaniach *ex vivo*. Według mojej oceny cel pracy został zaprezentowany krótko i bardzo zrozumiale, a sam pomysł Autorki, dotyczący oceny roli kardioprotekcyjnej białka Klotho w uszkodzeniach niedokrwienno-reperfuzyjnych serca uważam za bardzo nowatorski i zarazem – potrzebny obecnej wiedzy, zwłaszcza, iż doniesienia literaturowe w tym aspekcie są obecnie nieliczne.

W rozdziale „Materiały i metody”, liczącym 7 stron, Doktorantka opisuje zastosowane metody badawcze. Autorka badania eksperymentalne przeprowadziła na trzech modelach uszkodzeń niedokrwienno-reperfuzyjnych serca (IRI), tj. linii komórkowej ludzkich kardiomiocytów, izolowanych sercach szczurzych (perfundowanych metodą Langendorffa) oraz izolowanych kardiomiocytach szczurzych. Autorka bardzo dokładnie i precyzyjnie podzieliła wykonanie badań na dwa etapy, tj. badania eksperymentalne rozpoczęto od oznaczenia komórkowej ekspresji Klotho, a w drugim etapie - na poziomie tkankowym. Na uwagę zasługuje fakt, iż zastosowane metody badawcze były bardzo pracochłonne, a zarazem nowatorskie, a sam ich właściwy dobór (za co należy się uznanie Promotorowi pracy), w tym również testów analizy statystycznej, w pełni pozwolił na realizację postawionego celu i założeń badawczych, a to znalazło odzwierciedlenie w publikacji wyników w renomowanych czasopismach o wysokim IF.

W rozdziale „Wyniki” Doktorantka przedstawiła uzyskane wyniki badań w publikacjach badawczych, wchodzących w skład rozprawy doktorskiej. W publikacji, pt. „*Klotho protein contributes to cardioprotection during ischaemia/reperfusion injury*”. Autorka zaprezentowała uzyskane wyniki w 7. czytelnych i starannie opracowanych rycinach oraz w jednej tabeli. Doktorantka wykazała intensywną ekspresję genu KL i białka Klotho w linii komórkowej ludzkich miocytów serca (HCM) poddanych uszkodzeniach niedokrwienno-reperfuzyjnych (IRI), co potwierdzono następnie na poziomie tkankowym w izolowanych

sercach szczurzych, które w grupie IRI charakteryzowały się osłabioną funkcją mechaniczną oraz wykazały większe uszkodzenie. Wzmoczonej ekspresji białka Klotho w sercach poddanych IRI towarzyszyło również jego uwalnianie do perfuzatu, co korelowało z uszkodzeniem tkanki i obniżoną funkcją mechaniczną serc. Otrzymane wyniki wskazują na kompensacyjną syntezę Klotho w warunkach stresowych, w celu ochrony komórek serca przed IRI. Na uwagę wskazuje fakt, iż podaż rekombinowanego białka Klotho zwiększyła żywotność i aktywność metaboliczną komórek HCM, uszkodzonych w wyniku niedokrwienia/reperfuzji (IR), co według mojej oceny może być istotnym odkryciem naukowym i prognostycznym. Uzyskane wyniki badań przedyskutowane zostały z wykorzystaniem fachowego i współczesnego piśmiennictwa, gdyż 33 z 45 (73% pozycji) pochodziło z ostatnich 15. lat.

W artykule, pt. „*Ameliorating effect of Klotho protein on rat heart during I/R injury*” autorka zaprezentowała uzyskane wyniki w 7. dość czytelnych, ze względu na bardzo dużą ilość zaprezentowanych danych, ale starannie opracowanych rycinach oraz w jednej tabeli. Doktorantka trafnie wykazała na podstawie badań na poziomie tkankowym, iż IRI doprowadziło do istotnego obniżenia funkcji mechanicznej izolowanych serc szczurzych i do osłabienia kurczliwości izolowanych kardiomiocytów. Autorka trafnie zauważyła, iż suplementacja serc białkiem Klotho podczas IR przyczyniła się do poprawy parametrów hemodynamicznych oraz wyraźnego zwiększenia odzysku funkcji mechanicznej serc. Ciekawym faktem, według mnie, jest zaobserwowanie przez Doktorantkę, iż perfuzja serc z białkiem Klotho istotnie ograniczyła uszkodzenie tkanki sercowej, a po podaży tego białka podczas niedokrwienia/reperfuzji zaobserwowano wzmocnioną produkcję antyoksydantów i wysoką całkowitą zdolność antyoksydacyjną w sercach. Ponadto badania wykazały, że białko Klotho przyczyniło się do znacznego obniżenia ilości zdegradowanych białek kurczliwych, uwalnianych z uszkodzonych komórek serca. Według mojej wiedzy jako recenzenta, a zarazem

diagnosty laboratoryjnego i lekarza, powyższe informacje mogą okazać się w przyszłości cennymi danymi w opracowaniu nowej strategii leczenia pacjentów z chorobami układu sercowo-naczyniowego z uszkodzeniami niedokrwienno-reperfuzyjnymi kardiomiocytów, jednakże bez wątplenia wymaga to dalszych wielośrodkowych badań. Należy zauważyć, iż w powyższym artykule wykorzystano fachowe i współczesne piśmiennictwo, gdyż 33. z 45. cytowań (73%) pochodzi z ostatnich 15. lat.

W rozdziale „Podsumowanie” Autorka potwierdziła kardioprotekcyjną rolę białka Klotho w sercu podczas niedokrwienia/reperfuzji na poziomie komórkowym i tkankowym. Białko Klotho syntezowane było kompensacyjnie w odpowiedzi na uszkodzenie i może posłużyć jako marker niedokrwiennych zmian *myocardium* w przyszłości. Doktorantka wywnioskowała także, iż białko Klotho przyczynia się do poprawy czynności serca i ograniczenia dysfunkcji skurczowych, poprzez obniżenie stresu oksydacyjnego i degradacji białek kurczliwych przez enzymy proteolityczne i może stanowić nowy czynnik prewencyjny, i/lub terapeutyczny podczas ostrych zespołów wieńcowych. Dlatego też w pełni zgadzam się z Autorką, iż wyniki niniejszej rozprawy doktorskiej mogą być podstawą do opracowania nowej strategii diagnostyczno-terapeutycznej pacjentów z chorobami sercowo naczyniowymi. Zgodnie z moją wiedzą potwierdzam, iż są to pierwsze badania na świecie, które wykazały kardioprotekcyjny wpływ białka Klotho z wykorzystaniem modelu uszkodzeń niedokrwienno-reperfuzyjnym serca (IRI).

Z obowiązku jako Recenzenta przedłożonej rozprawy doktorskiej chciałbym wskazać na nieliczne błędy literowe i usterki redakcyjne, np. sformułowanie na str 7. wers 5. „IRI HCM”, powinno być napisane jako „IRI w komórkach linii komórkowej HCM”, co byłoby bardziej zrozumiałe. Według mnie Autorka, w celu podkreślenia ważności własnych badań i ich wykorzystania w przyszłości w kardiologii, powinna osobno wydzielić podrozdział „Wnioski” i zakończyć część merytoryczną rozprawy doktorskiej - jednym lub dwoma

konkretnymi konkluzjami. Brakuje być może wniosku, odpowiadającego na pytanie: jak uzyskane wyniki badań białka Klotho mogłyby przyczynić się w przyszłości do lepszego rokowania leczenia pacjentów z chorobami układu sercowo-naczyniowego z uszkodzeniami niedokrwienno-reperfuzyjnymi komórek mięśnia sercowego? Oczywiście ostatnia moja sugestia nie była celem badań rozprawy doktorskiej, ale zapewne będzie celem kolejnych badań Autorki i zespołu badawczego kierowanego, z bardzo dużymi sukcesami, przez dr hab. n. farm. Iwona Bil-Lulę. Wskazane przeze mnie niedociągnięcia nie ujmują w żadnym wypadku wysokiej jakości rozprawy doktorskiej.

Podsumowując uważam, iż przedłożona do recenzji dysertacja jest przemyślaną oraz dobrze zaprojektowaną pracą i zawiera wszystkie wymagane elementy związane z rozprawą doktorską. Stanowi zbiór trzech publikacji, które zostały opublikowane w cenionych czasopismach naukowych, a łączny wskaźnik Impact Factor wyniósł aż 11,659 i 225 pkt MNiSW. Wyniki badań przedstawiono w publikacjach w sposób logiczny, rzetelny, przejrzysty i konsekwentny, co potwierdza umiejętność Doktorantki w projektowaniu i prowadzeniu prac badawczych. Należy jeszcze raz podkreślić, iż uzyskanie wyników badań wymagało od Autorki ogromnego wysiłku i pracowitości, co cechuje zastosowane metody badawcze. Na uwagę zasługuje wysoki procentowy udział w powyższych publikacjach Autorki, wynoszący w przypadku pracy pogładowej aż 90%, a pracach eksperymentalnych – po 70%. W związku z powyższym wnioskuję o uznanie powyższej dysertacji za wyróżniającą się.

Ponadto należy zauważyć, iż Doktorantka, będąc na początku swojej kariery naukowej, obecnie posiada bardzo duży dorobek naukowy, tzn. jest współautorem 7. publikacji naukowych o łącznym IF=23,077 i 535 pkt MNiSW, a także monografii naukowych oraz aż 35. streszczeń zjazdowych, co odzwierciedla wysoką aktywność naukową Autorki, zarówno w kraju jak i za granicą.

Podsumowując stwierdzam, że rozprawa Pani Agnieszki Olejnik, pt. „Rola białka Klotho podczas uszkodzenia niedokrwienno-reperfuzyjnego mięśnia sercowego” spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim w postępowaniu o nadanie stopnia doktora, prowadzonego zgodnie z art. 179 ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. - prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1669 ze zm.) oraz według ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2017 r. poz. 1789). W związku z powyższym mam zaszczyt przedłożyć Wysokiej Radzie Dyscypliny Nauki Farmaceutyczne wniosek o dopuszczenie Pani mgr Agnieszki Olejnik do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Podpis recenzenta

Prof. dr hab. Sławomir Ławicki

