



Dr hab. n. med. Olga Ciepiera
Zakład Medycyny Laboratoryjnej
Warszawski Uniwersytet Medyczny
Ul. Banacha 1a, 02-097 Warszawa
Tel. 22 5992405
e-mail: olga.ciepiela@wum.edu.pl

Warszawa, 23.05.2021

Recenzja rozprawy doktorskiej

Mgr Agnieszki Olejnik

**pt. „Rola białka Klotho podczas uszkodzenia niedokrwienno-reperfuzyjnego mięśnia
sercowego”**

Promotor pracy: dr hab. n. farm. Iwona Bil-Lula

Choroby sercowo-naczyniowe są szeroko rozpowszechnione w społeczeństwie. W ich konsekwencji umiera kilkanaście tysięcy osób rocznie, stawiając tę grupę chorób na pierwszym miejscu spośród wszystkich przyczyn zgonów, tuż przed chorobami nowotworowymi. Skutkiem niewydolności układu sercowo-naczyniowego może być zawał mięśnia sercowego – martwica komórek serca w wyniku ich niedotlenienia. Uszkodzenie niedokrwienno-reperfuzyjne (IRI) powstaje po przywróceniu, czasowo przerwane, krążenia krwi w tkance lub narządzie. IRI jest procesem zapalnym, w którym obserwuje się charakterystyczne zmiany w komórkach, zmiany biochemiczne które prowadzą do klinicznie jawnej dysfunkcji serca. Doktorantka w swojej pracy podjęła się zbadania potencjalnego mechanizmu kardioprotekcyjnego w IRI, który zmniejszałby stopień uszkodzenia komórek pozwalając jednocześnie na przywrócenie prawidłowej funkcji serca po niedokrwieniu i reperfuzji. Za cel badawczy przyjęła ocenę wpływu białka Klotho na kardiomiocyty. Biorąc pod uwagę wysoką śmiertelność, która związana jest z IRI, cel pracy jest doskonale uzasadniony i wpisuje się w tematykę aktualnie ważnych, z punktu widzenia populacji,

problemów ochrony zdrowia. Z drugiej strony, badania nad funkcją białka Klotho stanowią obecnie bardzo gorący temat i w tym względzie przedstawiona mi do recenzji praca również pozostaje niezwykle aktualna.

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska ma charakter opracowania opartego o zbiór trzech już opublikowanych monotematycznych artykułów naukowych. W skład zbioru wchodzi dwie prace oryginalne pełnotekstowe i jedna przeglądowa, we wszystkich publikacjach autorka jest pierwszym autorem. Sumaryczny wskaźnik oddziaływania prac (IF) wynosi 11,759; a uzyskana liczba punktów ministerialnych to 225. Na uwagę zasługuje podkreślenie, że IF prac oryginalnych wchodzących w skład opracowania wynosi ponad 9,5 co jednoznacznie podkreśla wysoki poziom naukowy rozprawy. Rozprawa składa się ze streszczeń w języku polskim i angielskim, teoretycznego wstępu, celu pracy, rozdziału opisującego materiały i metody, krótkiego omówienia prac składających się na rozprawę, wykazu skrótów, piśmiennictwa i załączników: kopii trzech publikacji będących podstawą do ubiegania się o stopień naukowy doktora, oświadczeń współautorów publikacji określających ich udział w pracy oraz analizy bibliometrycznej Doktorantki. Pomimo umieszczenia w publikacjach informacji o uzyskaniu pozytywnej opinii właściwej Komisji Bioetycznej na temat przeprowadzanych eksperymentów, w rozprawie zabrakło załącznika z właściwym dokumentem.

W liczącym 9 stron wstępie Doktorantka opisuje bardzo wyczerpująco funkcje białka Klotho oraz mechanizm jego działania. Podkreśla zarówno rolę tego białka w procesach starzenia i eksperymenty, które przeprowadzono na transgenicznym myszom z wyłączonym genem dla białka Klotho (*KI/KI*). Warto może wspomnieć, że linia tych myszy powstała przez przypadek w wyniku mutacji insercyjnej jednego genu i rozpadu genów w tym miejscu. Linia ta początkowo wydawała się bezużyteczna, jednak ujawniający się w czwartym tygodniu życia fenotyp starzenia się i zgon po około dwóch miesiącach, skłonił badaczy do pochylenia się nad funkcją brakującego u zwierząt transgenicznym genu właśnie w procesach starzenia. Ta część wstępu pozwala czytelnikowi w pełni zapoznać się z rolą białka Klotho zarówno w chorobach nerek, gdzie może pełnić funkcję biomarkera dysfunkcji narządów; jak i w nowotworach czy chorobach sercowo-naczyniowych (CVD), w których wykazano, że niskie stężenie tego białka koreluje ze stopniem włóknienia mięśnia sercowego, a także może pełnić funkcję markera ryzyka rozwoju CVD w przebiegu chorób nerek. Doktorantka bardzo krótko opisała biochemiczny mechanizm uszkodzenia niedokrwienno-reperfuzyjnego mięśnia

sercowego, podkreślając rolę stresu oksydacyjnego w degradacji proteolitycznej aparatu kurczliwego serca. Jednak w tej części pracy zabrakło omówienia czym właściwie jest uszkodzenie niedokrwienno-reperfuzyjne i kiedy do niego dochodzi, nie tylko w odniesieniu do serca.

Założenia i cele pracy zostały sformułowane w sposób jasny i odpowiadający założeniom metodologicznym pracy. Głównym celem badawczym była ocena roli białka Klotho i jego wpływu na mechanizmy kardioprotekcyjne w uszkodzeniu niedokrwienno-reperfuzyjnym serca w badaniach *in vitro* i *ex vivo*.

Wyniki badań zostały przedstawione wyczerpująco w formie cyklu publikacji. Artykuły, wchodzące w skład rozprawy stanowią spójną, logiczną całość. Wszystkie dotyczą roli Klotho w uszkodzeniu niedokrwienno-reperfuzyjnym serca, praca przeglądowa stanowiąca niejako wstęp do zasadniczej części badań, wyczerpująco przedstawia aktualną wiedzę na temat funkcji badanego białka. W pełnotekstowych pracach oryginalnych autorka prezentuje wyniki swoich badań, które pozwalają jednoznacznie wnioskować o kardioprotekcyjnej roli Klotho w IRI.

W publikacji przeglądowej: Olejnik A, Franczak A, Krzywonos-Zawadzka A, Kałużna-Oleksy M, Bil-Lula I. The Biological Role of Klotho Protein in the Development of Cardiovascular Diseases. *Biomed Res Int.*2018;5171945. doi: 10.1155/2018/5171945 doktorantka opisuje budowę białka Klotho, jego formy oraz rolę w odniesieniu do regulacji równowagi jonowej, funkcji nerek czy przytarczyc. W tym artykule mgr Olejnik opisuje również rolę regulacyjną białka Klotho w stanie stresu oksydacyjnego i zapaleniach. Jako wstęp do dwóch oryginalnych publikacji Autorka umieściła również w pracy przeglądowej informacje na temat roli białka Klotho w chorobach sercowo-naczyniowych, ochronnego działania tego białka w uszkodzeniach niedokrwiennych m.in. mózgu oraz ochronnego działania Klotho na komórki serca w uszkodzeniu toksycznym miokardium. Zdaniem recenzenta jest to niezwykle ważne i wyczerpujące podsumowanie dotychczasowego stanu wiedzy na temat Klotho – warto podkreślić, że praca przeglądowa Autorki ma 17 stron i czerpie ze 136 pozycji piśmiennictwa w zdecydowanej większości opublikowanych w ciągu 5 lat poprzedzających zaprezentowane opracowanie. Tak przygotowany wstęp teoretyczny świadczy o ogromnym zaangażowaniu Doktorantki w projekt i jednocześnie pokreśla ogromną wiedzę na temat podejmowanego tematu badawczego.

Pierwszą zaprezentowaną pracą oryginalną pełnotekstową jest Olejnik A, Krzywonos-Zawadzka A, Banaszekiewicz M, Bil-Lula I. Klotho protein contributes to cardioprotection during ischaemia/reperfusion injury. *J Cell Mol Med.* 2020;24(11):6448-6458. doi: 10.1111/jcmm.15293. Celem pracy było zbadanie wpływu białka Klotho na tkankę serca poddawaną uszkodzeniu niedokrwienno-reperfuzyjnemu. Badanie zostało przeprowadzone na dwóch modelach – linii ludzkich kardiomiocytów oraz wyizolowanych perfundowanych sercach szczurzych. Autorka wykazała, że w komórkach poddawanych IRI obserwowana jest wyższa ekspresja genu *Kl*, a co za tym idzie również wyższa synteza białka niż w komórkach spoczynkowych. Stężenie białka Klotho w homogenizatach komórkowych oceniono metodą ELISA, ekspresję białka na komórkach badano metodą immunofluorescencji pośredniej a ekspresję genu za pomocą Real-Time PCR. Co więcej, Autorka wykazała, że dostarczenie egzogenego Klotho do hodowli komórkowej kardiomiocytów poddanych IRI skutkuje zwiększeniem żywotności komórek i ich aktywności metabolicznej. W modelu *ex vivo* Doktorantka zaobserwowała wzmożoną syntezę białka Klotho w sercach poddawanych niedokrwieniu, towarzyszącą zwiększonej zawartości dehydrogenazy mleczanowej – enzymu wewnątrzkomórkowego uwalnianego do przestrzeni pozakomórkowej w wyniku uszkodzenia komórek. Stężenie białka Klotho w sercach poddanych IRI było odwrotnie proporcjonalne do parametrów funkcji serca i wprost proporcjonalne do aktywności uwolnionego z uszkodzonych komórek LDH. Na podstawie przeprowadzonych badań Doktorantka wnioskuje, że Klotho może pełnić funkcję kardioprotekcyjną w uszkodzeniu niedokrwienno-reperfuzyjnym, a jego zwiększona synteza w sercach poddawanych uszkodzeniu stanowi mechanizm kompensacyjny, który ma zapobiegać uszkodzeniu i apoptozie komórek. W publikacji warto podkreślić bardzo dobrze prowadzoną dyskusję uzyskanych wyników i wnioski, które są w pełni poparte wynikami przeprowadzonych badań.

W ostatniej z publikacji cyklu: Olejnik A, Krzywonos-Zawadzka A, Banaszekiewicz M, Bil-Lula I. Ameliorating Effect of Klotho Protein on Rat Heart during I/R Injury. *Oxid Med Cell Longev.* 2020 Oct 17;2020:6427284. doi: 10.1155/2020/6427284 Doktorantka postanowiła zbadać rolę Klotho w sercu szczurzym i podjęła się sprawdzenia hipotezy wysnutej w poprzedniej pracy, w której zasugerowała kardioprotekcyjny efekt białka Klotho w modelu uszkodzenia niedokrwienno-reperfuzyjnego. Badanie zostało przeprowadzone w modelu zwierzęcym – na wyekstrahowanych sercach dorosłych szczurów Wistar. Serca poddano działaniu warunków tlenowych, tlenowych z suplementacją Klotho, niedokrwienno-

reperfuzyjnych i niedokrwienno-reperfuzyjnych z suplementacją Klotho. Procedury badawcze obejmowały ocenę parametrów hemodynamicznych serc, ocenę kurczliwości kardiomiocytów, analizę stężenia wolnych rodników tlenowych i azotowych oraz analizę uwalniania z komórek markerów śmierci kardiomiocytów. Autorka wykazała, że w sercach poddanych IRI egzogenne białko Klotho powoduje przywrócenie zarówno parametrów hemodynamicznych do stanu sprzed niedokrwienia i reperfuzji, jak i częstości uderzeń serca. W wyizolowanych szczurzych kardiomiocytach zaobserwowano pozytywny wpływ Klotho na kurczliwość mięśnia serca po przebytych IRI, jednocześnie kardiomiocyty wyizolowane z serc poddanych działaniu warunków niedokrwienno-reperfuzyjnych i suplementacji Klotho wykazywały istotnie niższe uwalnianie LDH, co spowodowane było zmniejszeniem odsetka komórek martwych po zadziałaniu IRI. Konkludując, Autorka podkreśliła, że przeprowadzone badania wskazują na kardioprotekcyjne działanie białka Klotho, jednak dokładne wyjaśnienie mechanizmu tego oddziaływania wymaga dalszych badań. Podobnie jak w poprzedniej pracy na uwagę zasługuje bardzo dobrze prowadzona dyskusja.

Z obowiązku recenzenta wspomnieć muszę o nielicznych błędach literowych we wstępie do rozprawy. Zwracam również uwagę na konieczność rozwijania skrótów, stosowanych w opracowaniu po raz pierwszy – jak chociażby CVD i IRI na stronie 13 rozprawy. W żaden sposób nie umniejsza to jednak wartości naukowej pracy i nie rzutuje na całość opracowania, które jest zdecydowanie wyróżniające się.

Podsumowując, rozprawę na stopień naukowy doktora nauk farmaceutycznych mgr Agnieszki Olejnik oceniam bardzo wysoko. Doktorantka wykazała dobre przygotowanie teoretyczne, opanowanie warsztatu badawczego oraz umiejętność analizy uzyskanych wyników. Wyniki rozprawy wskazują wyraźnie na efekt kardioprotekcyjny Klotho i zdaniem recenzenta powinny stanowić teoretyczne podłoże do prób zastosowania tego białka w schematach terapeutycznych *in vivo*, początkowo oczywiście na modelu zwierzęcym. Cykl trzech publikacji to rozprawa kompletna – poprowadzona niezwykle sprawnie od podstaw teoretycznych do eksperymentalnego potwierdzenia badanej tezy. Dobór metod badawczych i testów statystycznych pozwala w wyczerpujący sposób potwierdzić badaną tezę. Autorka krok po kroku we właściwym schemacie eksperymentalnym udowadnia ważną rolę białka Klotho w IRI. Zarówno publikacje i cała rozprawa jest pisana bardzo płynnie i czyta się je z nieukrywaną przyjemnością.

W mojej ocenie rozprawa spełnia warunki określone w artykule 13 Ustawy z dnia 14.03.2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki, dlatego wnoszę do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauki Farmaceutyczne Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu o dopuszczenie pani mgr Agnieszki Olejnik do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Biorąc pod uwagę wysoką wartość naukową pracy, wnioskuję również o wyróżnienie rozprawy.

Warszawa, 23.05.2021

Dr hab. n. med. Olga Ciepela


KIEROWNIK
Zakładu Medycyny Laboratoryjnej
Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego
dr hab. n. med. Olga Ciepela