

Dr hab. n. med. Andrzej Potemkowski

Szczecin, 2 lutego 2024

Profesor nadzw. Uniwersytetu Szczecińskiego

Kierownik Katedry Psychologii Klinicznej i Psychoprofilaktyki

Instytutu Psychologii Uniwersytetu Szczecińskiego

## **Recenzja**

rozprawy doktorskiej mgr **Szymona Dawida Wnęka**

zatytułowanej:

***„Znaczenie wybranych mikroRNA w patogenezie miażdżycy tętnic szyjnych i ich potencjalna rola jako biomarkera powikłań miażdżycy”***

Promotor: Dr hab. n. med. Miłosz Kawa

Promotor pomocniczy: Dr n. med. Anna Sobuś

### **1. Ocena merytoryczna pracy**

#### **a. Trafność podjętej tematyki jej oryginalność**

Miażdżycę tętnic rozwijającą się latami i zwężającą tętnice w sposób asymptotyczny jest przyczyną około 50% wszystkich zgonów w społeczeństwach zachodnich i jest głównym czynnikiem wywołującym choroby serca i mózgu.

Operacyjne metody eliminacji blaszek miażdżycowych są skuteczną formą profilaktyki przeciwwudarowej u pacjentów ze zwężeniem tętnicy szyjnej na tle miażdżycy. Przeprowadzanie endarterektomii u takich pacjentów jest też zarazem jednym z bardziej dyskusyjnych problemów klinicznych w chirurgii naczyniowej, głównie ze względu na ryzyko okołoperacyjne. Poszukiwanie dlatego molekularnych metod diagnostycznych oceniających dynamikę rozwoju zmian miażdżycowych w naczyniach szyjnych u pacjentów z

bezobjawowym zwężeniem tętnicy szyjnej i należących do grupy ryzyka rozwoju chorób naczyniowych mózgu lub zaburzeń krążenia ma szczególne znaczenie. Identyfikacja i właściwa ocena ryzyka wystąpienia incydentów niedokrwiennych u pacjentów asymptomatycznych mogłaby zapobiec znaczącej liczbie udarów mózgu. W tym celu bardzo zasadne jest poszukiwanie metod o wysokiej dokładności diagnostycznej, mogących w obiektywny i nieinwazyjny sposób określić dynamikę rozwoju miażdżycy, co mogłyby być oceniane w codziennej praktyce klinicznej.

Z tych powodów wybór przez Doktoranta tematu ocenianej przeze mnie pracy naukowej uważam za szczególnie aktualny i uzasadniony.

#### **b. Uzyskane rezultaty i ich znaczenie dla nauki i praktyki**

Doktorant uzyskał szereg bardzo ważnych wyników.

Stwierdził, że:

- istotne hemodynamicznie zwężenie tętnicy szyjnej wewnętrznej związane było ze znamienym statycznie wzrostem poziomu ekspresji mikroRNA wewnątrzkomórkowych: miR-21-3p, miR-134-5p, miR-296-5p, miR-122-5p, miR-150-5p, miR-27a-5p, miR-34-5p oraz miR-223-3p. W tej grupie stwierdził też obniżenie poziomu ekspresji mikroRNA wewnątrzkomórkowych: miR-23a-3p, miR-30b, miR-16-5p. Blaszkki miażdżycowe w porównaniu do niezmiętej miażdżycowo ściany tętnicy miały istotnie podwyższony poziom ekspresji: miR-9-5p, miR-126-3p, miR-134-5p, miR-296-5p, miR-122-5p, miR-126-5p, miR-133b, miR-150-5p, miR-17-3p, miR-17-5p, natomiast znamienne statystycznie obniżony w przypadku: miR-23a-3p, miR-27a-5p, miR-34-5p, miR-223-3p.
- zwężenie tętnicy szyjnej wewnętrznej związane było ze znamienym statycznie obniżeniem stężenia ekspresji osoczowych czynników angio-protekcyjnych: EGF, FGF-beta oraz BMP-2 i Interleukiny-6,
- stężenie metaloproteinaz - MMP-1 i MMP-3 było regulowane istotnie w dół u pacjentów przed operacyjnym usunięciem blaszki miażdżycowej w celu udrożnienia tętnicy szyjnej wewnętrznej, a żaden z osoczowych czynników angio-protekcyjnych nie wykazywał zwiększonej ekspresji u pacjentów z istotnym hemodynamicznie zwężeniem tętnicy szyjnej wewnętrznej
- przed zabiegiem operacyjnym usunięcia blaszki miażdżycowej w erytrocytach krążących we krwi obwodowej pobranej istotnie obniżony był poziom aktywności antyoksydantów: CAT i SOD oraz stężenie zredukowanego glutationu a poziom aktywności enzymatycznej reduktazy glutationowej był istotnie podwyższony

- przed zabiegiem operacyjnym usunięcia blaszki miażdżycowej w płytkach krwi krążących we krwi obwodowej pobranej istotnie obniżony był poziom aktywności antyoksydantów: CAT, SOD i GSH oraz reduktazy glutationowej a także stężenie zredukowanego glutationu,
- żaden z enzymów odpowiedzialnych za obronę antyoksydacyjną w erytrocytach oraz płytkach krwi nie wykazywał zwiększonej aktywności enzymatycznej u pacjentów z istotnym hemodynamicznie zwężeniem tętnicy szyjnej wewnętrznej.

Wszystkie powyższe wyniki uważam za szczególnie znaczące dla nauki i praktyki klinicznej bowiem pogłębiają one wiedzę odniesioną do populacji polskich pacjentów.

### **c. Poprawność formalno-językowa, stylistyczna i interpunkcyjna**

Praca została napisana zwracającą uwagę poprawną polszczyzną oraz z należytą starannością formalno-językową. Styl przygotowania pracy świadczy o umiejętności Doktoranta w zakresie posługiwania się językiem naukowym, a także znajomością specyfiki pojęciowej zastosowanej w omawianym obszarze badań.

## **2. Ocena metodologiczna pracy**

### **a. Dobór piśmiennictwa i umiejętność wykorzystania źródeł**

Piśmiennictwo opracowane jest bardzo skrupulatnie. Cytowanych jest 83 pozycji piśmiennictwa, wśród których znajdują się prace oryginalne, poglądowe i monografie.. Doktorant dowodzi umiejętności swobodnego korzystania z literatury naukowej, a trafność doboru piśmiennictwa i umiejętność interpretacji wyników przeprowadzonych badań w kontekście istniejącego stanu wiedzy przemawia za dojrzałością naukową Doktoranta.

### **b. Poprawność formułowania celów, problemów i hipotez**

Podążając za aktualnymi trendami naukowymi w badanym obszarze Doktorant w bardzo przemyślany, poprawny sposób formułuje bardzo czytelne badawcze cele naukowe, którymi są:

1.Ocena względnego poziomu ekspresji wybranych mikroRNA wewnątrzkomórkowych ustalonych na podstawie funkcji regulacyjnej w określonych procesach związanych z:

- a. angiogenezą i metabolizmem śródbłonna oraz niedokrwieniem tkankowym (miR-9-5p, miR-21-3p, miR-23a-3p, miR-126-3p, miR-134-5p, miR-296-5p);

b. apoptozą, stanem zapalnym i stresem oksydacyjnym oraz miażdżycą (miR-30b, miR-122-5p, miR-133b, miR-146a, miR-150-5p i miR-155-5p);

c. proliferacją i cyklem komórkowym (miR-16-5p, miR-17-3p, miR-17-5p, miR-27a-5p, miR-34-5p, miR-200c-5p i miR-223-3p);

2. Ocena stężenia wybranych osoczowych czynników białkowych o właściwościach angioprotekcyjnych i związanych z homeostazą naczyniowej tkanki łącznej (Angiopoetyna-1, BMP-2, BMP-4, EGF, FGFa, FGFb, VEGF, MMP-1, MMP-3, TIMP-1, Kolagen-1-alfa, IL-6).

3. Ocena antyoksydantów enzymatycznych i nieenzymatycznych osobno w erytrocytach i płytkach krwi, obejmującej aktywność reduktazy glutationowej, dysmutazy ponadtlenkowej, peroksydazy glutationowej, transferazy S-glutationowej, katalazy oraz stężenie glutationu zredukowanego.

### **c. Trafność doboru metod i narzędzi badawczych, umiejętność ich zastosowania**

Metody i narzędzia badawcze dobrane zostały bardzo właściwie i bardzo dokładnie opisane.

Doktorant poddał analizie 48 pacjentów ( 28 mężczyzn oraz 20 kobiet ze średnią wieku 63,5 lat) zakwalifikowanych do operacyjnego usunięcia blaszki miażdżycowej podczas zabiegu CEA przeprowadzanego w Klinice Chirurgii Naczyniowej PUM z rozpoznaniem bezobjawowego jednostronnego istotnego hemodynamicznie zwężenia tętnicy szyjnej wewnętrznej, natomiast nie podano w jakim okresie przeprowadzono badania. Kryteria włączenia i wyłączenia zostały precyzyjnie określone. Zwężenie tętnicy szyjnej wewnętrznej ocenione ultrasonograficznie po stronie zakwalifikowanej do zabiegu endarteriektomii wynosiło  $\geq 70\%$ , natomiast po stronie nieobjętej zabiegiem operacyjnym było mniejsze niż 50%.

Po uzyskaniu świadomej zgody, celem zakwalifikowania do grupy badanej na podstawie wyniku badania USG Doppler i po stwierdzeniu występowania jednostronnego istotnego hemodynamicznie zwężenia tętnicy szyjnej wewnętrznej w przedziale 70-99%, każdy pacjent przechodził pełne badanie podmiotowe i przedmiotowe. Oceniano czas trwania przebiegu i leczenia choroby podstawowej związanej ze zwężeniem tętnic szyjnych, obecność przewlekłych schorzeń współwystępujących, listę przyjmowanych leków, czasokres palenia

tytoniu, liczbę wypalanych paczek papierosów w celu obliczenia skumulowanej liczby wypalonych papierosów, przedstawionej w tzw. paczkolatach. Doktorant wykonywał pomiar ciśnienia tętniczego krwi, obliczając średnie ciśnienie tętnicze, obliczał wskaźnik WHR, tj. stosunek obwodu talii do bioder oraz aktualny wskaźnik masy ciała (BMI).

#### **d. Prawdliwość układu pracy i struktury podziału treści**

Praca ma układ typowy dla rozpraw doktorskich, z jasno wydzielonymi rozdziałami i podrozdziałami podporządkowanymi merytorycznym celom pracy. Praca zawiera łącznie 98 stron maszynopisu w tym 2 tabele i 10 rycin.

Dysertację rozpoczyna *Wstęp* liczący 20 stron maszynopisu, wprowadzający bardzo dobrze czytelnika w problematykę, którą zajmuje się dalej Doktorant, a ponadto świadczy o jego znakomitym przygotowaniu do tematu. Autor przedstawia przejrzyste poglądy dotyczące podstawowej wiedzy o patogenezie miażdżycy i jej rozwoju, unaczynieniu szyi i mózgowia, zwężeniu tętnicy szyjnej i jej następstwach, dalej obrazowaniu tętnic szyjnych i zmian miażdżycowych. Ciekawie, szczególnie dla klinicysty, Doktorant omawia charakterystykę mikro RNA, jego biogenezę, oddziaływanie na poziomie komórkowym, funkcje biologiczne i aktywność regulacyjną, szczególnie związaną z miażdżycą. Dalszą część wstępu stanowi omówienie roli czynnika wzrostu śródbłonna naczyniowego ( VEGF ), naskórkowego czynnika wzrostu ( EGF ), czynnika wzrostu fibroblastów ( FGF ), interleukiny 6, metal proteiny macierzy zewnątrzkomórkowej (MMPs) oraz białka morfogenetycznego kości (BMPs). Całość *Wstępu* w pełni uzasadnia celowość przeprowadzenia własnych badań.

Doktorant zawarł w drugim rozdziale *Założenia teoretyczne i cele badania*. trzy cele pracy, które jak już podkreśliłem, uważam za interesujące i bardzo dobrze przemyślane.

Kolejny, trzeci rozdział liczący 14 stron to *Material i metody*. W tym rozdziale Doktorant kolejno, bardzo szczegółowo omawia poszczególne, skomplikowane, laboratoryjne metody badań, które przeprowadza w swojej dysertacji. Zastosowane metody badań świadczą o niezwykle sumiennym, konkretnym podejściu Doktoranta do realizacji tematu i nie budzą moich zastrzeżeń.

*Statystyczne opracowanie wyników* - przeprowadzone zostało w oparciu o obowiązujące zasady, co też zostało w rozdziale przedstawione bardzo czytelnie i świadczy o

dobrym wprowadzeniu w zagadnienia, tak ważne dla prowadzonych licznych analiz statystycznych.

Rozdział czwarty to **Wyniki**. Wszystkie uważam za szczególnie znaczące z punktu widzenia polskiej praktyki klinicznej bowiem pogłębiają one wiedzę dotyczącą leczenia niedokrwionego udaru mózgu. Zostały one przedstawione bardzo czytelnie, dodatkowo zilustrowane czytelnymi rycinami.

W rozdziale **Dyskusja** Doktorant na ponad 5 stronach interpretuje otrzymane wyniki, ale ze względu na nieliczne, wcześniejsze publikacje w tym temacie, oparte także na odmiennej metodyce i zawierające różne grupy pacjentów nie może szeroko porównać swoich danych z danymi innych autorów. Mimo to Autor w sposób klarowny, ale jednocześnie wyważony, interpretuje uzyskane przez siebie wyniki. Ustosunkowuje się do każdego problemu, którego próby oceny podjął się w rozprawie.

Ostatni, szósty rozdział stanowią **Wnioski**, których jest 4 i w pełni stanowią one jasne odpowiedzi na sformułowane cele badania.

**Streszczenie**, również w języku angielskim, prezentuje najważniejsze zagadnienia poruszane w rozprawie.

#### **e. Uwagi i propozycje**

Badania przeprowadzone w toku realizacji przewodu doktorskiego zostały bardzo starannie przemyślane a uzyskane wyniki dokładnie opisane i przedstawione. Wielką wartością tej pracy jest połączenie tematyki medycznej, a zwłaszcza aspektów diagnostyki medycznej w obszarze chorób naczyniowo-mózgowych oraz wyników analiz molekularnych, w których biotechnologia medyczna obecnie wiezie prym w dziale innowacyjnej medycyny translacyjnej, rozwijającej się intensywnie w XXI w. Doktorantowi udało się połączyć ze sobą obszary tematyki klinicznej i analiz molekularnych materiału biologicznego co stanowi pionierskie osiągnięcie w tematyce współczesnej medycyny i diagnostyki klinicznej. Uważam, że Autor powinien w publikacji przygotowywanej do druku śmiało sformułować także praktyczne wnioski wynikające z pracy tak ważne w diagnostyce neurologicznej.

#### **f. Podsumowanie**

Rozprawa mgr Szymona Dawida Wnęka przygotowana jest wyjątkowo starannie, w czytelny, logiczny sposób prowadzona jest myśl przewodnia i analiza wyników. Recenzowana przeze mnie praca stanowi samodzielny i oryginalny dorobek i wykazuje umiejętność samodzielnej pracy naukowej oraz imponującą ogólną wiedzę teoretyczną Doktoranta. Praca w pełni odpowiada wymogom Ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki na stopień doktora nauk medycznych i dlatego mam zaszczyt przedstawić wysokiej Radzie Naukowej Dyscypliny Nauki Medyczne Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie rozprawę mgr Szymona Dawida Wnęka do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Z punktu widzenia klinicysty ze względu na wartość naukową pracy wnoszę o jej wyróżnienie.

Z poważaniem

A. Poteloch