instytut biologii doświadczalnej
im. Marcelego Nenckiego PAN

Warszawa 6.04.2021

Prof. dr hab. Agnieszka Dobrzyń
Dyrektor Instytutu
Kierownik Pracowni Sygnałów Komórkowych i Zaburzeń Metabolicznych
Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego, PAN
ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa

Ocena rozprawy doktorskiej lek. Karola Urbańskiego

Stan zapalny okołonaczyniowej tkanki tłuszczowej w regulacji funkcji śródbłonka naczyniowego w ludzkich naczyniach krwionośnych

Dostępne wyniki badań wskazują na funkcjonalną zależność pomiędzy tkanką tłuszczową oraz naczyniami krwionośnymi. Prawie wszystkie naczynia krwionośne są otoczone przez okołonaczyniową tkankę tłuszczową (PVAT), której właściwości wydzielnicze są kluczowe dla regulacji ich metabolizmu i funkcji. M.in. otyłość wywołuje stan zapalny PVAT, zwiększając wydzielenie cytokin pro-zapalnych, co prowadzi do zmian funkcjonalnych komórek śródbłonka i uszkodzenia naczyń krwionośnych. Stan zapalny jest ściśle powiązany z rozwojem miażdżycy naczyń wieńcowych, co może doprowadzić do niedotlenienia mięśnia sercowego. Tym niemniej niewiele jest wiadomo o mechanizmach regulujących metabolizm i funkcję okołosercowej i okołonaczyniowej tkanki tłuszczowej prowadzących do remodelingu naczyń krwionośnych w chorobach serca i miażdżycy. Dlatego też, główny cel recenzowanej rozprawy tj. określenie wzajemnych powiązań fenotypu PVAT i jego stanu zapalnego z funkcją śródbłonka naczyniowego w naczyniach krwionośnych pacjentów z chorobą niedokrwienną serca, jest trafny i bardzo interesujący.

Praca doktorska lek. Karola Urbańskiego zrealizowana została w Katedrze Chorób Wewnętrznych i Medycyny Wsi Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie, pod kierunkiem prof. Tomasza Guzika, który jest wybitnym autorytetem w tematyce stanu zapalnego naczyń krwionośnych. Rozprawa ma typowy układ dla tego typu dysertacji. Maszynopis ma 130 stron. Całość jest podzielona na następujące rozdziały: 1) Wstęp (32 strony), 2) Cele pracy (1 strona), 3) Materiał i metody (11 stron), 4) Wyniki (29 stron), 5) Podsumowanie wyników (2 strony),

6) Dyskusja (8 stron), 7) Wnioski (1 strona), 8-9) Streszczenia w języku polskim i angielskim (po 5 stron), 10) Spis skrótów (strony), 11) Spis rycin (2 strony), 12) Spis tabel (1 strona), 13) Piśmiennictwo (23 strony). Rozprawa została przygotowana starannie pod względem edycyjnym. Nie uniknięto jednak kilku niedociągnięć. W zestawieniu skrótów brakuje polskich rozwinięć, m.in. dla ICAM-1, INFγ, LFA-1, MCP-1, VCAM-1 itp., chociaż istnieje polskie nazewnictwo dla tych cząsteczek. Poza tym, nie uniknięto używania żargonu laboratoryjnego, np. sformułowanie „martwe debris komórkowe". W rozprawie nieprawidłowo (tj. bez spacji) także zapisuje się stężenia substancji, np. 0,05mmol/l powinno być 0,05 mmol/l itp. Te drobne uchybienia nie mają oczywiście wpływu na wartość naukową zaprezentowanych rezultatów.

W rozdziale Wstęp doktorant przedstawił szczegółowe informacje dotyczące miażdżycy, dysfunkcji śródbłonka naczyń, funkcjonowania okołonaczyniowej tkanki tłuszczowej i jej roli powstawaniu stanu zapalnego. Rozdział ten zawiera wszystkie niezbędne informacje, które umożliwiają czytelnikowi zrozumienie tematyki badań zaprezentowanej w dalszej części rozprawy. Jest on, tak jak i cała praca, napisany klarownym językiem, a zrozumienie zamieszczonych w nim informacji ułatwiają dwie ryciny oraz tabela.

Szczegółowe cele pracy zostały przedstawione w sposób klarowny i skupiły się na: 1) określeniu profilu ekspresji genów tkanki tłuszczowej w zależności od lokalizacji, stopnia nasilenia miażdżycy oraz nacieku komórek zapalnych; 2) charakterystyce limfocytów T w różnych rodzajach tkanki tłuszczowej; 3) określeniu nacieku limfocytów T regulatorowych w PVAT oraz ich związku z funkcją komórek śródbłonka, 4) zbadaniu wpływu PVAT oraz cytokin prozapalnych na funkcję śródbłonka naczyniowego w kontekście infiltracji tej tkanki przez komórki zapalne. Przeprowadzone eksperymenty pozwoliły na pełną naukową weryfikację tych zagadnień.

Modelem doświadczalnym w zaprezentowanych badaniach były tłuszcz nasierdziowy znad tętnicy wieńcowej ze zwężeniem krytycznym, tłuszcz podskórny oraz fragmenty tętnicy piersiowej wewnętrznej wraz otaczającą tkanką tłuszczową. Materiał ten został pozyskany, po uzyskaniu zgody pacjenta, w trakcie operacji pomostowania aortalno-wieńcowego z użyciem tętnicy piersiowej wewnętrznej. Próby te posłużyły do analizy markerów powierzchniowych, komórek T regulatorowych oraz wewnątrzkomórkowej produkcji cytokin za pomocą cytometrii przepływowej, oceny funkcji śródbłonka naczyniowego *ex vivo* oraz analizy ekspresji genów przy użyciu TaqMan Array Micro Fluidic Cards.

Rozdział „Materiał i metody" przynosi stosunkowo dokładne opisy przeprowadzonych procedur eksperymentalnych. Pokazuje on, że doktorant opanował szereg trudnych i nowoczesnych

metod badawczych. Do tego dochodzi sumienna analiza statystyczna otrzymanych wyników, w zależności od potrzeby, za pomocą testu wariancji, testu t-studenta, analizie regresji wielokrotnej. Wszystko to potwierdza duży potencjał naukowy doktoranta.

Dane uzyskane w czasie realizacji pracy doktorskiej zostały przedstawione w postaci 6 tabel oraz 13 złożonych rycin. Zarówno ryciny jak i tabele zostały przedstawione w sposób bardzo czytelny. Do najciekawszych rezultatów otrzymanych przez Doktoranta z pewnością należą wykazanie, że: 1) PVAT otaczająca tętnice wieńcowe dotknięte nasiloną miażdżyca ma zwiększoną ekspresję genów związanych z procesami zapalnymi oraz odpowiada fenotypowi białej tkanki tłuszczowej podczas gdy PVAT z naczyń niedotkniętych miażdżycą ma zwiększoną ekspresję genów związanych z brunatnieniem tkanki tłuszczowej; 2) znaczną część limfocytów T w PVAT stanowią komórki T_{RM} nie powracające do krążenia, które charakteryzują się większą zdolnością do produkcji cytokin zapalnych; 3) PVAT wykazuje bezpośredni wpływ na naczynia krwionośne upośledzając funkcje śródbłonka naczyniowego i efekt ten jest zależny od nasilenia okołonaczyniowego stanu zapalnego; 4) IFNγ powoduje upośledzenie funkcji śródbłonka naczyń, podczas gdy TNFα nie wywołuje takiego efektu. Rozdział 'Wyniki' napisany jest czytelnym językiem i przedstawia bardzo interesujące i nowatorskie dane.

Uzyskane przez siebie wyniki doktorant omówił w oparciu o najnowsze dane opublikowane w piśmiennictwie światowym. Podkreślić należy fakt umieszczenia w spisie cytowanych publikacji aż 340 pozycji, których większość została opublikowana w ostatnich latach. Cała dyskusja dowodzi, że pan Karol Urbański świetnie zna i bardzo łatwo porusza się w trudnych zagadnieniach związanych z funkcją wydzielniczą tkanki tłuszczowej i funkcjonowaniem naczyń krwionośnych. Zwięzłe podsumowanie wyników badań zawarto w 6 wnioskach, które trafnie podsumowują wykonane badania i są odpowiedzią na stawiane w pracy cele.

Niezależnie od mojej bardzo wysokiej oceny dysertacji, czuję się w obowiązku przedstawić kilka uwag i pytań, które nasunęły mi się po jej wnikliwym przestudiowaniu. Proszę o ustosunkowanie się do nich w czasie obrony:

1. Przeprowadzone badania wykazały, że tkanka tłuszczowa produkuje duże ilości IFNγ oraz TNFα, jednak wykonane eksperymenty *ex vivo* pokazały, że tylko IFNγ wywiera negatywny wpływ na funkcję śródbłonka naczyniowego. W związku z tym, istotnym wydaje się pytanie jakie znaczenie funkcjonalne/metaboliczne może mieć zwiększona produkcja TNFα przez adipocyty?

2. Na początku rozdziału Dyskusja przedstawiano schemat prezentujący podsumowanie przedstawionych w rozprawie wyników (Rycina 18). W podpisie do tej ryciny oraz w tekście zabrakło jednak klarownego opisu przedstawionych na niej procesów. Proszę o zaprezentowanie i omówienie tej ryciny w czasie obrony.
3. W PVAT pochodzącym z tętnicy piersiowej wewnętrznej z wysokim oraz niskim poziomem stanu zapalnego stwierdzono zmiany w ekspresji wielu genów zaangażowanych w metabolizm lipidów. Czy wiadomo jak te zmiany mogą wpływać na funkcjonowanie śródbłonka naczyń?

Wniosek końcowy

Pracę doktorską pana Karola Urbańskiego pt. „*Stan zapalny okołonaczyniowej tkanki tłuszczowej w regulacji funkcji śródbłonka naczyniowego w ludzkich naczyniach krwionośnych*" oceniam bardzo wysoko. Rozprawa zawiera wyniki oryginalnych badań i stanowi istotny wkład w poznanie roli okołonaczyniowej tkanki tłuszczowej na funkcjonowanie układu sercowo-naczyniowego. Stwierdzam, że rozprawa doktorska pana Karola Urbańskiego spełnia warunki określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2003 r. Nr 65, poz. 595; z 2005 r. Nr 164, poz. 1365; z 2010 r. Nr 96, poz. 620, Nr 182, poz. 1228; z 2011 r. Nr 84, poz.455). Zwracam się zatem do Rady Dyscypliny Nauki Medyczne Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie pana Karola Urbańskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Równocześnie, biorąc pod uwagę wysoki poziom naukowy prowadzonych badań oraz ich nowatorski charakter, wnioskuję o wyróżnienie tej rozprawy odpowiednią nagrodą. Wnioskując o nagrodę mam świadomość, iż przyjętą polityką CMUJ jest nagradzanie prac doktorskich już opublikowanych w czasopismach naukowych. Tym niemniej, w przypadku tematyki podjętej w pracy doktorskiej pana Karola Urbańskiego, która jest oparta o wyjątkowo skomplikowany paradygmat badawczy i przedstawia bardzo wartościowe wyniki naukowe, jest duża szansa, że będzie ona opublikowana w wiodącym czasopiśmie. Uważam, że podjęcie decyzji o publikacji wyników w prestiżowych czasopismach, co zwykle wiąże się z wielomiesięcznym przesunięciem publikacji w czasie, nie powinno pozbawiać doktoranta możliwości uzyskania nagrody za Jego pracę.

A. Dobrzyń