



Gdańsk, 17 maja 2021

Prof. dr hab. med. Rafał Olszanecki  
Przewodniczący Rady Dyscypliny Nauki Medyczne  
Uniwersytet Jagielloński - Collegium Medicum

Recenzja pracy doktorskiej lek. med. Karola Urbańskiego pt. „Stan zapalny okołonaczyniowej Tkanki Tłuszczowej w Regulacji Funkcji Śródbłonna Naczyniowego w Ludzkich Naczyniach Krwionośnych”.

Praca doktorska lek. med. Karola Urbańskiego to monografia licząca 130 stron tradycyjnie zawierająca Wstęp, Cele Pracy, Materiał i Metody, Wyniki, Podsumowanie Wyników, Dyskusję, Wnioski, Streszczenia po polsku i po angielsku, Spisy skrótów, rycin, tabel oraz Piśmiennictwo. Praca jest przygotowana bardzo starannie i szczególnie cenne są graficzne i opisowe podsumowania wyników i wniosków.

Głównym zagadnieniem którego dotyczy praca doktorska były wzajemne powiązania fenotypu okołonaczyniowej tkanki tłuszczowej i jej stanu zapalnego z funkcją śródbłonna naczyniowego w naczyniach krwionośnych pacjentów z chorobą niedokrwienną serca.

Tkanka tłuszczowa była pierwotnie traktowana jako magazyn lipidowych substratów energetycznych. Wraz z odkryciem leptyny stało się jasne, że tkanka ta, czy właściwie narząd ma szereg funkcji endokrynych. Z kolei badania metodami biologii komórkowej wykazały, że tkanka tłuszczowa zawiera wiele rodzajów komórek innych niż adipocyty, w tym komórki układu immunologicznego, co jest szczególnym obiektem zainteresowania niniejszej rozprawy. Tkanka tłuszczowa ma wiele lokalizacji, przy czym ta zlokalizowana w okolicy elementów układu sercowo-naczyniowego ma rolę szczególną i wykazuje znaczący wpływ na funkcjonowanie tego układu. Jednym z najważniejszych czynników jest stan zapalny. Wiadomo, że znaczne nasilenie stanu zapalnego w trzewnej tkance tłuszczowej prowadzi do otyłości, insulinooporności i w konsekwencji przyczynia się do rozwoju patologii sercowo-naczyniowych. W tym ostatnim kontekście okołonaczyniowa tkanka tłuszczowa budzi szczególne zainteresowanie gdyż poza ogólnoustrojowymi patologiami może również na drodze oddziaływań parakrynych wpływać na stan pobliskich naczyń. Dlatego temat rozprawy doktorskiej której celem była charakterystyka stanu zapalnego w okołonaczyniowej tkance tłuszczowej oraz zbadanie powiązań z funkcją naczyń uważam za niezwykle ważny i dotychczasowo niedostatecznie zbadany.



Szczegółowe cele pracy obejmowały:

1. Porównanie profilu ekspresji wybranych genów charakteryzujących fenotyp tkanki tłuszczowej w zależności od lokalizacji, nasilenia miażdżycy oraz nacieku komórek zapalnych.
2. Szczegółową charakterystykę limfocytów T obecnych w badanych kompartmentach tkanki tłuszczowej.
3. Zbadanie nacieku limfocytów T regulatorowych w okołonaczyniowej tkance tłuszczowej oraz jego związku z funkcją śródbłonna naczyniowego.
4. Analizę wpływu okołonaczyniowej tkanki tłuszczowej oraz cytokin prozapalnych na funkcję śródbłonna naczyniowego w kontekście infiltracji tej tkanki przez komórki zapalne.

Praca opiera się przede wszystkim o analizę materiału klinicznego pochodzącego od 131 pacjentów poddawanych operacji pomostowania aortalno-wieńcowego z powodu choroby niedokrwiennej serca z użyciem przeszła z tętnicy piersiowej wewnętrznej (IMA). Pobierane były fragmenty tkanki tłuszczowej otaczającej tętnicę wieńcową z krytycznym zwężeniem, fragmenty tkanki tłuszczowej podskórnej oraz fragment tętnicy IMA wraz tkanką tłuszczową okołonaczyniową.

Materiał ten podany był analizie profilu ekspresji mRNA wybranych genów z zastosowaniem Real-Time PCR. Tkanekę tłuszczową poddano również enzymatycznej procedurze w celu wyizolowania komórek frakcji stromalnej. Komórki te oraz komórki jednojądrzaste krwi obwodowej (PBMC) analizowane były za pomocą cytometrii przepływowej.

Przeprowadzono również bardzo ciekawe eksperymenty polegające na ko-inkubacji tkanki tłuszczowej pozyskanej z patologicznie zmienionych fragmentów naczyń z krążkami naczyniowymi z tętnicy piersiowej wewnętrznej (IMA) oraz analizie zależnych od śródbłonna reakcji naczyniowych. Efekty porównano z wpływem cytokin.

Techniki te są niezwykle wymagające, a efektywne przeprowadzenie badań z ich zastosowaniem świadczy o zdobyciu przez doktoranta bardzo zróżnicowanych i trudnych umiejętności.

Podstawowe wyniki badań przeprowadzonych w ramach pracy doktorskiej to:

1. Tkanekę tłuszczową okołonaczyniową (PVAT) otaczającą tętnicę wieńcową dotkniętą nasiloną miażdżycą wykazuje zwiększoną ekspresję genów związanych z procesami zapalnymi. Stwierdzono również, że PVAT otaczająca IMA niedotkniętą miażdżycą wykazuje wysoką ekspresję genów związanych z brunatnym fenotypem tkanki tłuszczowej.



2. Naciek komórek zapalnych w PVAT wokół IMA jest związany ze zwiększoną ekspresją genów dla visfatyny, p22phox, IL-10 i CTLA-4.
3. Ok. połowę limfocytów T obecnych w tkance tłuszczowej stanowiły komórki T<sub>RM</sub> nie powracające do krążenia. PVAT otaczający IMA charakteryzował się mniejszym odsetkiem komórek T<sub>RM</sub> w porównaniu z PVAT CORO (tętnic wieńcowych) i tkanką tłuszczową podskórną.
4. Limfocyty T obecne w tkance tłuszczowej charakteryzowały się wysoką zdolnością do produkcji cytokin zapalnych IFN $\gamma$  i TNF $\alpha$ .
5. Limfocyty T<sub>RM</sub> CD4+ obecne w tkance tłuszczowej wykazywały większą zdolność do produkcji IFN $\gamma$  oraz TNF $\alpha$  niż komórki powracające do krążenia. Zwracał uwagę większy udział komórek CD8+/CD69 w produkcji IFN $\gamma$  w PVAT CORO niż w PVAT IMA.
6. Nie wykazano różnic w odsetku komórek Treg pomiędzy kompartmentami tkanki tłuszczowej oraz krwi. Zaobserwowano dodatnią korelację pomiędzy odsetkiem komórek Treg w tkance tłuszczowej nasierdziowej i otaczającej IMA oraz krwią. Naczynia od pacjentów z wyższym odsetkiem komórek Treg we krwi charakteryzowały się lepszą funkcją śródbłonna naczyniowego. Nie zaobserwowano zależności pomiędzy funkcją śródbłonna naczyniowego i odsetkiem komórek Treg w PVAT.
7. Inkubacja naczyń krwionośnych z PVAT powodowała upośledzenie funkcji śródbłonna naczyniowego. Stopień upośledzenia funkcji śródbłonna wzrastał wraz ze zwiększeniem ilości komórek zapalnych w PVAT.
8. Inkubacja naczyń krwionośnych z IFN $\gamma$  powodowała upośledzenie funkcji śródbłonna naczyniowego. Inkubacja z TNF $\alpha$  nie wywoływała takiego efektu. Nie obserwowano efektu synergistycznego badanych cytokin.

Główne wnioski to:

1. PVAT otaczający naczynia wieńcowe dotknięte nasiloną miażdżycą wykazuje cechy aktywnego stanu zapalnego, niepełnego zróżnicowania oraz fenotypowo odpowiada białej tkance tłuszczowej. Naciek komórek zapalnych w PVAT jest związany z nadekspresją genów dla adipocytokin związanych ze stresem oksydacyjnym i stanem zapalnym.
2. Znaczną część limfocytów T w PVAT stanowią komórki T<sub>RM</sub> nie powracające do krążenia. Przeważają one zwłaszcza w PVAT otaczającym dotknięte miażdżycą naczynia wieńcowe.



3. Limfocyty T obecne w PVAT wykazują dużą zdolność do produkcji cytokin zapalnych. Limfocyty T<sub>RM</sub> charakteryzują się większą zdolnością do produkcji cytokin zapalnych w porównaniu do komórek powracających do krwioobiegu.
4. Większy dsetek limfocytów T regulatorowych we krwi obwodowej koreluje z lepszą funkcją śródbłonna naczyniowego.
5. PVAT wykazuje bezpośredni wpływ na naczynia krwionośne upośledzając funkcje śródbłonna naczyniowego, a wielkość tego efektu jest zależna od nasilenia okołonaczyniowego stanu zapalnego.
6. IFN $\gamma$  wykazuje bezpośredni wpływ na naczynia krwionośne upośledzając funkcje śródbłonna naczyniowego. Nie obserwowano takiego efektu pod wpływem działania TNF $\alpha$

Wyniki pracy doktorskiej podkreślają znaczenie lokalnej tkanki tłuszczowej w kontrolowaniu mechanizmów zapalnych, dysfunkcji śródbłonna i miażdżycy w pobliskich naczyniach. W moim przekonaniu szczególnie interesujące jest wsparcie dla koncepcji, że indukcja zmiany fenotypu okołonaczyniowej tkanki tłuszczowej w kierunku brunatnej może kontrolować proces miażdżycowy.

Praca przygotowana jest niezwykle starannie i napisana w sposób klarowny i trudno jest wnieść jakiegokolwiek uwagi. Można jedynie zapytać biorąc pod uwagę unikalny charakter uzyskanego materiału czy rozważano zastosowanie bardziej kompleksowych procedur analizy profilu ekspresji mRNA (RNA-seq czy mikromacierze). Ciekawe by były również niecelowane analizy proteomiczne. Z pewnością nie pozwoliły by na tak dokładną ocenę wybranej grupy elementów, jednak pozwoliły by na określenie kontekstu, czy są to jedyne zmiany czy stanowią one element głębszego przeprogramowania fenotypu. Mam też pytanie czy stwierdzono jakiegokolwiek różnice związane z płcią? Nie jest to wprawdzie optymalna grupa ze względu na wiek i znacznie większą liczebność mężczyzn.

Mam kilka bardzo drobnych uwag technicznych, np. w Tabeli 5 nie wiadomo to jakich porównań odnosi się wartość p; w podsumowaniu wyników część zdań jest w czasie teraźniejszym a część w przeszłym; poprawniej jest napisać test t-Studenta z S dużą literą bo to nazwisko; lepiej jest napisać izolowani mRNA, a nie izolowano kwasy mRNA. Dobrze było też zachować spójność w sekwencji opisów (opis badań ekspresji genów jest na końcu w Metodach a na początku w Wynikach). Bardzo ograniczone są również dane kliniczne pacjentów. Interesujące było by porównanie ogólnoustrojowych markerów stanu zapalnego (CRP), danych hematologicznych czy obwodowych stężeń adipokiny. Na pewno warto by również nieco bardziej rozwinąć dyskusję np. o implikacje medyczne uzyskanych wyników.



Wymienione uwagi do ocenianej przeze mnie pracy w żadnej mierze nie umniejszają jej bardzo wysokiej wartości naukowej oraz praktycznej. Praca stanowi znaczący wkład w zrozumienie mechanizmów patologicznych w układzie sercowo-naczyniowym. Badania te mogą pomóc w opracowaniu nowych terapii hamujących progresję miażdżycy. Oceniana praca spełnia wszystkie kryteria stawiane rozprawie doktorskiej.

Wnoszę do Rady Dyscypliny Nauki Medyczne Uniwersytetu Jagiellońskiego, Collegium Medicum w Krakowie o dopuszczenie lek. med. Karola Urbańskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ponadto, biorąc pod uwagę wysoką wartość uzyskanych wyników zarówno dla badań podstawowych i praktycznych oraz zastosowanie trudnych modeli eksperymentalnych wykorzystujących unikalny materiał kliniczny składam dodatkowy wniosek o wyróżnienie.

Z poważaniem

**KIEROWNIK**  
Katedry i Zakładu Biochemii  
Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego  
*Ryszard T. Smoleński*  
prof. dr hab. *Ryszard Tomasz Smoleński*