

Kierownik Katedry Urologii
Collegium Medicum im. L. Rydygiera w Bydgoszczy
Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu
Redaktor Naczelny *Central European Journal of Urology*
Wiceprzewodniczący Polskiego Towarzystwa Urologicznego

Ocena

Rozprawy doktorskiej mgr **Marii Skrzypkowskiej**

na temat: "**Aktywność komórek progenitorowych śródbłonna w nadciśnieniu
tętnicznym**"

1. Uwagi ogólne i redakcyjne

Rozprawa doktorska mgr Marii Skrzypkowskiej pt: "Aktywność komórek progenitorowych śródbłonna w nadciśnieniu tętnicznym" napisana jest w sposób typowy dla pracy doświadczalnej. Praca zawiera 209 stron wydruku komputerowego podzielonego na 5 rozdziałów, rozbudowany i dobrze przygotowany słowniczek i spis skrótów, streszczenie, wnioski, bibliografie i wykaz 8 własnych publikacji ściśle powiązanych z tematem pracy. Muszę jednak przyznać, iż nie wiem czy taki osobny wykaz własnych prac jest koniecznie potrzebny. Muszę, również podkreślić, iż w przypadku tak obszernych publikacji (207 stron) przydałaby się recenzentowi forma zapisana elektronicznie, ułatwiłoby to przygotowanie recenzji np. w trakcie podróży.

Rozprawa napisana jest poprawnie po polsku, czyta się ją dobrze, jest ciekawa. Rozplanowanie rozdziałów typowe dla pracy eksperymentalnej jest prawidłowe. Miałbym pewne uwagi do objętościowego rozplanowania rozdziałów. Szczególnie wstępu, w którym myślę, że można ograniczyć dość znacznie informacje dotyczące zagadnień związanych z hodowlami "in vitro" komórek śródbłonna, gdyż to zagadnienie nie jest ściśle powiązane z przedmiotem rozprawy

a badania prowadzone przez Doktorantkę mają charakter analizy "ex vivo" komórek uzyskanych od pacjentów. Doktorantka sama zresztą wielokrotnie podkreśla znaczne różnice między badaniami nad hodowlami komórkowymi a analizą komórek uzyskanych bezpośrednio od pacjentów. Praca dzięki temu byłaby trochę bardziej przejrzysta. Niemniej podkreślam, że wstęp jest ciekawy i przeczytałem go z przyjemnością.

Nie stwierdziłem istotnych błędów językowych a jedynie drobne niezręczności, takie jak rozpoczęcie zdania od "ponieważ" (str.14), czy "Test ANOVA rang...wykazał rozbieżności". Test sam w sobie nic nie wykazuje, to Doktorantka powinna wykazywać i wskazywać na rozbieżności (str. 70). Doktorantka bardzo często podpira się zresztą stwierdzeniem, że test statystyczny wykazał bądź udowodnił (str. 75). Myślę, że test statystyczny jest tylko jednym z narzędzi pracy i sam w sobie nie może mieć nadrzędnego znaczenia, jaki mu Doktorantka często przypisuje. To na Doktorantce spoczywa ciężar odpowiedzialności za wyniki i ich komentarz. Stwierdzenie takie jak, "z punktu widzenia angiologii" (str. 14) też nie powinno być stosowane. Angiologia nie ma swojego punktu widzenia. Spis piśmiennictwa jest nowoczesny i zawiera 333 pozycje w tym pozycje nowe (nie starsze niż 10 lat) stanowią około 60% tej bogatej bibliografii. Część pozycji starszych jest z pewnością niezbędna dla wnikliwej analizy tematu dysertacji a czasopisma źródłowe, takie jak Cell, Lancet, Science, NEJM, Blood, Hypertension, Circulation, Stem Cells czy Nature użyte w takim wypadku mają ugruntowaną pozycję światową i stanowią niezbędną podstawę do przedstawienia tematu. Bibliografia jest świetnie uporządkowana, dobrze cytowana i przejrzysta w tekście. Niewielkie pomyłki w skrótach czasopism nie mają żadnego znaczenia. Miałbym pewne uwagi do skomplikowanego systemu numeracji tabel i rycin. Wiem, że jest ich bardzo dużo, ale myślę, że można by nieco go uprościć. Uwaga ta nie ma jednak, żadnego wpływu na wysoką ocenę jakości tej dysertacji.

2. Merytoryczna ocena pracy

Autorka w *Wstępie* obszernie przedstawiła uzasadnienie podjęcia tematu, opisując cytologię śródbłonka, jego dojrzewanie, czynność autokrynną i parakrynną. Opisała czynniki związane z nadciśnieniem, które modulują czynność i dojrzewanie śródbłonka, ze szczególnym uwzględnieniem tlenu azotu i angiotensyny. Jedyne ostatnia strona wstępu utraciła płynność tekstu, jaką przez cały ten rozdział niezwykle zrecznie posługuje się Doktoranka. Należy podkreślić, iż Doktorantka wykazała się dużą znajomością tematu opisując niezwykle ciekawie zagadnienia dotyczące pochodzenia komórek śródbłonka i powiązania tych informacji z patogenezą nadciśnienia pierwotnego. Dywagacje prowadzone na ten temat są interesujące i świadczą o dogłębnej znajomości tematu, choć podkreślam jeszcze raz, w mojej ocenie wstęp jest zbyt mocno rozbudowany, jak na wymagania rozprawy doktorskiej.

Próba powiązania procesów komórkowych i zjawisk klinicznych, świadczy o wnikliwej obserwacji nowoczesnych trendów w nauce. Oczywistym jest fakt, iż próba opisanie i przygotowanie czytelnika do analizy tych zagadnień jest trudna i wymaga kunsztu literackiego jak i szerokiej znajomości tematu, czym wykazała się Doktorantka. Zagadnienia dotyczące analizy klinicznych aspektów diagnostyki i leczenia nadciśnienia dla osoby nie będącej klinicystą mogą być trudnym zadaniem, jednak sposób ich przedstawienia powoduje, iż czytelnik z łatwością może objąć tematykę tych rozważań. To trudne zagadnienie wymaga rozważnego spojrzenia zarówno od strony zagadnień biologii jak i praktyki klinicznej. Należy jeszcze raz podkreślić, iż Doktorantka świetnie orientuje się we wszystkich aspektach tematu dysertacji.

Wstęp daje świetną podstawę do zaprezentowania celów pracy, które mają odpowiedzieć na pytanie czy obecność nadciśnienia tętniczego wiąże się ze zmianą ilościową i czynnościową komórek progenitorowych scharakteryzowanych jako CD34(+) i CD34(+)VEGFR2(+), czyli jakie czynniki wpływają na te komórki u osób ze świeżo rozpoznany nadciśnieniem tętniczym.

Kolejnym pytaniem jest, czy długotrwałe leczenie nadciśnienia wpływa na profil komórek progenitorowych populacji CD34(+) i CD34(+)VEGFR2(+) oraz jakie znaczenie w tym przypadku ma stopień uszkodzenia śródbłonna, wiek pacjentów oraz zagrożenie rozwojem chorób sercowo-naczyniowych. Wydaje mi się, że ostatni cel badań powstał później, po wykonaniu prac badawczych, gdyż zakłada on sam w sobie zaburzenia liczby i cech komórek CD34(+) i CD34(+)VEGFR2(+) u chorych z nadciśnieniem, ale jest bardzo istotny z punktu widzenia klinicznego.

W rozdziale *Material i Metody* Doktorantka wyczerpująco i przejrzysto opisała warsztat pracy oraz przebadany materiał kliniczny. Grupy pacjentów przedstawione i scharakteryzowane zostały w bardzo dokładny sposób (str. 49 i 50). Można jedynie żałować, iż ich liczebność w niektórych podgrupach nie jest duża, dotyczy to przede wszystkim grupy leczonej, która podzielona jest na podgrupę lepiej i gorzej kontrolowaną. Jeżeli do tego dodamy potencjalne zmienne wynikające z dymorfizmu płciowego, wagi ciała i wieku to uzasadnione są problemy w zakresie uzyskania istotności statystycznej, na które zresztą zwraca uwagę sama Doktorantka między innymi na stronach 65, 81, 140, 141, 142 i innych. Muszę przyznać, iż zdaję sobie sprawę, jak trudne bywa skompletowanie dużych grup badawczych z odpowiednio długim okresem obserwacji.

Następnie Doktorantka opisała wszystkie materiały i narzędzia laboratoryjne, którymi się posługiwała. Opisała też dokładnie wszystkie metody łącznie z ich walidacją. Opisała dokładnie bramkowanie badanych komórek i otrzymywanie właściwych populacji, co jest niezwykle ważne w przypadku badania wielu antygenów jednocześnie. Rozdział materiał i metody kończy przedstawienie testów statystycznych użytych w analizie badanego materiału.

Rozdział *Wyniki* napisany jest obszernie, omówione są w nim wszystkie zależności, które Doktorantka chciała zbadać. Użyte metody obrazowania danych i ich interpretacja statystyczna nie budzi moich wątpliwości. Doktorantka wykazała, iż u osób ze świeżo wykrytym nadciśnieniem

tętnicznym wzrastają odsetki i liczby komórek CD34(+) oraz CD34(+)NO(+) a także CD34(+)VGFRII(+)-Kit(+) i CD34(+)VGFRII(+)-Kit(+)NO(+) w porównaniu do zdrowych i tych, u których kontrola ciśnienia jest gorsza. Ważnym spostrzeżeniem jest, iż leczeni pacjenci, u których nie osiągnięto celu terapeutycznego charakteryzują się mniejszymi odsetkami oraz liczbą komórek CD34(+)VGFRII(+) oraz CD34(+)VGFRII(+)NO(-) niż chorzy, u których zastosowana terapia pozwoliła na kontrolę ciśnienia tętniczego. Gorszą kontrolą leczenia wiąże się również ze spadkiem odsetka i liczby komórek CD34(+)VGFRII(+)-CD133(+). U osób z leczonym nadciśnieniem tętniczym dochodzi do spadku populacji komórek CD34(+)VGFRII(+)-CXCR4(+) i CD34(+)VGFRII(+)-CXCR4(+)-NO(+). Doktorantka wykazała, iż angiotensyna II, która jest jednym z najważniejszych regulatorów ciśnienia tętniczego wpływa na populacje progenitorowych komórek śródbłonna, co szczególnie istotne, tych które charakteryzują się ekspresją receptora VGF oraz produkują tlenek azotu. Bardzo ważna jest obserwacja, iż u pacjentów poddanych długiemu leczeniu nadciśnienia obserwuje się odmienne zależności w porównaniu do osób nowo zdiagnozowanych, co sugeruje różne czynniki wpływające na wielkość populacji komórek progenitorowych wykazujących ekspresję receptora dla VGF w początkowych i późniejszych etapach choroby nadciśnieniowej.

Rozdział **Dyskusja** napisany jest wyczerpująco. Rozdział obejmuje szeroką dyskusję zagadnień badanych w pracy. Czytanie tego rozdziału to duża przyjemność. Doktorantka odnosi się do istotnych zagadnień i profesjonalnie porównuje swoje wyniki do prac innych badaczy. W całej dyskusji widać pełną świadomość Doktorantki dotyczącą badanego problemu. Zagadnienia dotyczące różnych populacji komórek progenitorowych śródbłonna w rozwoju i leczeniu nadciśnienia to problem niezwykle istotny i mogący mieć w przyszłości bardzo duży wpływ na leczenie pacjentów z pierwotnym nadciśnieniem. Podjęcie tego tematu przez Doktorantkę niewątpliwie poszerza wiedzę dotyczącą komórek progenitorowych śródbłonna, tym bardziej, iż

wyniki otrzymane w tej pracy nie zawsze są zbieżne z danymi uzyskiwanymi przez innych badaczy. Zagadnienia omawiane w *Dyskusji* utwierdzają mnie w przekonaniu, iż Pani mgr Skrzypkowska potrafi świetnie połączyć elementy kliniczne z badaniami eksperymentalnymi. To jest niezwykle cenne u badacza. Sposób interpretacji zjawisk jak i wiedzę jaką prezentuje w *Dyskusji* Pani mgr Skrzypkowska oceniam bardzo wysoko.

Dyskusję kończą trzy główne wnioski, sformułowane klarownie, które jak najbardziej odpowiadają założeniom przyjętym w celach pracy. Wnioski te są uzupełnione podwnioskami. Ostatni i jak mniemam generalny wniosek mówiący o zależności między skutecznym leczeniem nadciśnienia a stanem śródbłonna jest prawdziwy, jednak zawiera w sobie pewną nieprawidłowość dotyczącą interpretacji pojęć. Regeneracja jest zjawiskiem dotyczącym tkanek a nie komórek. W związku z tym, uważam, że powinien brzmieć następująco; “skuteczne leczenie nadciśnienia tętniczego nie przywraca w sposób pełny czynności i liczby populacji komórek zdolnych do regeneracji śródbłonna naczyniowego.”

3. Ocena końcowa

Całą pracę oceniam jako zwartą, interesującą oraz przesiąkniętą świeżym spojrzeniem. Podkreślam zasługi naukowe Doktorantki dla rozwoju danej dyscypliny wiedzy i składam wniosek do Wysokiej Rady Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie Pani mgr Marii Skrzypkowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.