

## Recenzja

rozprawy doktorskiej **Pani Aleksandry Legeza-Zdunek**

p.t. „*Wpływ białka HMGB 1 na właściwości barierowe i immunomodulacyjne śródbłonna naczyniowego w patogenezie miażdżycy*”

wykonanej w Klinice Chorób Wewnętrznych i Farmakologii Klinicznej  
Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

Promotor: **Prof. dr hab. nauk med. Marlena Broncel**

Promotor pomocniczy: **dr nauk med. Paulina Gorzelak-Pabiś**

Miażdżycy jest przewlekłym stanem zapalnym. Stan zapalny, a w tym burza cytokinowa odgrywają istotną rolę w patogenezie miażdżycy oraz choroby niedokrwiennej serca. Wszystkie etapy procesu aterogenezy charakteryzują się dysfunkcją śródbłonna z późniejszym jego uszkodzeniem i nasileniem stanu zapalnego. W rzeczywistości, coraz więcej dowodów wskazuje, że zmiany miażdżycowe reprezentują serię wysoce swoistych odpowiedzi komórkowych i molekularnych, które można wspólnie opisać jako chorobę zapalną. Tak więc, oprócz akumulacji lipoprotein (LDL i VLDL), przedłużone zapalenie wywołane urazem jest obecnie uważane za kluczową przyczynę miażdżycy. Ponadto, wiele doniesień wskazuje, że białko grupy o wysokiej mobilności 1 (HMGB1) jest czynnikiem ułatwiającym patogenezę miażdżycy. Uszkodzenie pierwotnych komórek śródbłonna stymuluje wydzielanie HMGB1, prowadząc do nasilonej odpowiedzi zapalnej tychże komórek. Białko HMGB1 ujawnia unikalne funkcje biochemiczne jako alarmina, ale i także jako „toksyna” dla organizmu. W związku z tym, konieczne jest zrozumienie mechanizmów, za pomocą których te pozornie i diametralnie przeciwstawne funkcje są wywierane. W świetle dostępnej, ale niepełnej wciąż wiedzy, temat podjęty przez Doktorantkę należy uznać za niezwykle interesujący, ważny i bardzo aktualny.

Tytuł, jak i cel dysertacji zostały sformułowane dosyć ostrożnie. Badanie wpływu HMGB1 na funkcje śródbłonka jest raczej narzędziem, umożliwiającym poznanie mechanizmów uruchamianych przez to białko i prowadzących do inicjacji i/lub progresji aterogenezy. Jest to tylko drobna uwaga edytorska. Na szczególne podkreślenie zasługują dobrze zaplanowane doświadczenia oraz kierunek prowadzonych badań, który Autorka konsekwentnie realizowała, dążąc do wykazania znaczącej roli białka HMGB1 w miażdżycy.

Cykl doświadczeń Doktorantka podzieliła na dwa etapy. W pierwszym etapie - badała działanie białka HMGB1 na integralność śródbłonka naczyniowego, oceniając wartości impedancji monowarstwy komórkowej a także ekspresję mRNA okludyny. Oceniała także apoptozę oraz aktywację zapalną komórek HUVEC poprzez badania ekspresji mRNA chemokiny MCP-1 i interleukiny-33 (IL-33). W drugim etapie podjęła próbę oceny ewentualnego współdziałania HMGB1 z lipopolisacharydem bakteryjnym (LPS) w indukcji wcześniej badanych efektów. Przedstawiona sekwencja doświadczeń pozwala na weryfikację postawionych hipotez dotyczących zarówno roli, jak i mechanizmów działania białka HMGB1 na funkcję śródbłonka naczyniowego, szczególnie na jego integralność w warunkach hodowli *in vitro*.

Zastosowana metodyka badań jest nowoczesna i w pełni zapewnia realizację założonych celów. Mój niepokój wzbudzają jednak stosowane w doświadczeniach stężenia HMGB1: 0.1 µg/ml, 1 µg/ml oraz 2.5 µg/ml. Aby działać jako sygnał niebezpieczeństwa i mediator zapalny, białko HMGB1 musi być transportowane pozakomórkowo. Dzieje się tak na dwa zasadniczo różne sposoby: aktywne wydzielanie z żywych komórek zapalnych lub bierne uwalnianie z komórek martwiczych. W surowicy krwi pacjentów stwierdza się więc obecność HMGB1, ale w stężeniach znacznie niższych, rzędu ng/ml (np. zawał mięśnia sercowego: 0.4 – 2.2 ng/ml czy SLE: 1.3 – 32.3 ng/ml). *Czym zatem, kierowała się Autorka wybierając stosowane w swoich doświadczeniach stężenia HMGB1?* Wydaje się, że są one wręcz ekstremalnie wysokie, co może utrudniać interpretację i ewentualne odniesienie do warunków klinicznych.

Przedłożona do recenzji dysertacja doktorska ma typowy układ. Zachowane zostały prawidłowe proporcje pomiędzy poszczególnymi rozdziałami. We wstępie Doktorantka wychodząc od teorii zagrożenia opisuje budowę i funkcję białka HMGB1 oraz jego podstawowe receptory: TLR4 i RAGE. Omawia także biologiczne funkcje śródbłonka naczyniowego i jego rolę w patogenezie miażdżycy. W zwięzły sposób przedstawia charakterystykę chemokiny MCP-1 oraz interleukiny 33. Należy podkreślić, że ten rozdział jest niezwykle istotny i adekwatny do tematu rozprawy, a jednocześnie znakomicie wprowadza


Czytelnika w cele, które przyświecały Autorce w konstrukcji hipotez badawczych. Hipotezy, które znalazły się u podstaw badań zostały sformułowane jasno i szczegółowo.

Wyniki pracy Doktorantka przedstawiła w postaci 10-ciu czytelnych rycin i podsumowującej tabeli. Nie ustrzegła się jednak Autorka drobnego błędu redakcyjnego. Opisując wpływ białka HMGB1 na barierowe właściwości śródbłónka odwołuje się do ryciny 8 a powinna do ryciny 7. Podstawowym osiągnięciem Doktorantki jest wykazanie zróżnicowanego, zależnego od stężenia, działania białka HMGB1 na integralność śródbłónka naczyniowego. W niskim stężeniu HMGB1 (0.1 µg/ml) nie dochodzi do zmiany integralności śródbłónka mimo spadku ekspresji mRNA okludyny, podczas gdy przy wyższych stężeniach HMGB1 (1 µg/ml i 2,5 µg/ml) dochodzi do obniżenia integralności śródbłónka, przy jednoczesnym wzroście ekspresji genu okludyny. Ten, wydawałoby się nielogiczny wynik nie spotkał się z komentarzem Doktorantki. W mojej opinii, może on świadczyć o włączeniu w tychże warunkach mechanizmów potranskrypcyjnej regulacji biosyntezy okludyny z udziałem cząsteczek microRNA. Istotnym jest również wykazanie, iż zarówno HMGB1, jak i LPS nie powodują apoptozy komórek śródbłónka naczyniowego. W swoich doświadczeniach Autorka wykazała także wzrost ekspresji genu *MCP-1*, ale tylko w najwyższym stężeniu HMGB1 oraz przy jednoczesnej obecności LPS. Fakt ten ma istotne implikacje w patogenezie miażdżycy, sprzyja bowiem transmigracji monocytów do przestrzeni podśródbłonkowej. Interesującą i jednocześnie niezwykle ważną obserwacją jest fakt, iż jedynie w najniższym stosowanym stężeniu białko HMGB1 stymuluje transkrypcję genu *IL-33*. Autorka wynik ten komentuje stwierdzeniem, że w niskich stężeniach białko to działa immunomodulacyjnie. Wydaje się jednak, że wzrost ekspresji *IL-33* może mieć poważne implikacje patofizjologiczne zarówno w procesie aterogenezy, jak i w aktywacji kardioprotekcji zależnej od osi *IL-33/receptor ST2*.

Rozprawę wieńczy obszerna i bardzo ciekawa dyskusja, w której Doktorantka wykazała się wręcz znakomitą znajomością literatury przedmiotu badań a także krytyczną oceną uzyskanych wyników. Główną osią dyskusji jest patofizjologiczne znaczenie białka HMGB1 w szeregu różnych zaburzeń od siatkówki oka, retinopatii cukrzycowej przez wstrząs septyczny aż do ostrych zespołów wieńcowych i uszkodzeń niedokrwienno-reperfuzyjnych.

Kończące rozprawę wnioski zostały przedstawione w trzech punktach są bardzo ostrożne i wynikają bezpośrednio z wyników przeprowadzonych badań. Uważam, że przedstawione przez Doktorantkę wyniki wnoszą znaczący wkład w zrozumienie działania białka HMGB1 na komórki śródbłónka naczyniowego w aspekcie procesu aterogenezy.

Podsumowując uważam, że dysertacja doktorska lek. med. Aleksandry Legęza-Zdunek spełnia warunki stawiane rozprawom na stopień doktora nauk medycznych określone w art.13 ust.1 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595, z późn. zm.). Mam zaszczyt i przyjemność zawrócić się do Wysokiej Rady Nauk Medycznych Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi z wnioskiem o dopuszczenie lek. med. Aleksandry Legęza-Zdunek do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie, uwzględniając wysoką wartość merytoryczną rozprawy i nowatorski charakter wyników badań, wnoszę o jej wyróżnienie.

  
Dr hab. Grażyna Sygitowicz