



Uniwersytecki Szpital Kliniczny
im. Fryderyka Chopina w Rzeszowie

Uniwersytecki Szpital Kliniczny
im. Fryderyka Chopina w Rzeszowie
35-055 Rzeszów, ul. Szopena 2

Klinika Ginekologii, Ginekologii Onkologicznej i Położnictwa

Kierownik Kliniki: Prof. dr hab. n. med. Tomasz Kluz

Sekretariat: (17)8666351, Gabinet lekarski: (17)8666352, Dyżurka położnych: (17)8666353
email: biuro.ginekologia@szpital.rzeszow.pl

Nr umowy NFZ: 090100440320230801

RECENZJA

rozprawy na stopień doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu mgr Michaliny Bralewskiej pod tytułem „Molekularny mechanizm zjawiska preeklampsji - rola chromograniny A”.

Rozprawa doktorska „Molekularny mechanizm zjawiska preeklampsji – rola chromograniny A” napisana przez mgr Michalinę Annę Bralewską została przygotowana pod kierunkiem dr hab. Tadeusza Pietruchy oraz dr hab. n.med. Agaty Sakowicz pełniącej funkcję promotora pomocniczego. Całość prac eksperymentalnych została przeprowadzona w Zakładzie Biotechnologii Medycznej na Oddziale Nauk Biomedycznych Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi.

Głównym celem pracy doktorskiej była weryfikacja hipotezy, iż nieprawidłowa produkcja chromograniny A przez komórki łożyska może mieć związek z rozwojem stanu przedrzucawkowego. Dodatkowo w pracy dokonano oceny czy komórki trofoblastu mają zdolność do przeprowadzania enzymatycznego cięcia chromograniny A oraz wydzielania produktów tego cięcia, głównie katestatyny, do środowiska zewnątrzkomórkowego. Temat rozprawy doktorskiej wydaje się mieć istotne znaczenie z punktu widzenia ustalenia patomechanizmu zjawiska preeklampsji, który pomimo prowadzenia szeregu intensywnych badań przez ośrodki naukowe i kliniczne na całym świecie na przestrzeni ostatnich kilkudziesięciu lat, do chwili obecnej nie został w pełni poznany.

Praca doktorska została przygotowana w postaci zbioru trzech spójnych tematycznie artykułów naukowych opublikowanych w latach 2021-2023 w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym i współczynniku oddziaływania IF mieszczącym się w zakresie 3,105–6,208, oraz liczbie punktów Ministerialnych 100-140. Sumaryczny współczynnik *Impact*



Factor dla całego cyklu publikacji wynosi 15,521 a całkowita liczba punktów Ministerialnych przypisanych do cyklu została oszacowana na 380. Dwie spośród trzech publikacji wchodzących w skład cyklu stanowią prace oryginalne, natomiast trzeci artykuł jest zwięzłym przeglądem literaturowym wskazującym na rolę chromograniny A w ciąży. We wszystkich tych publikacjach, Pani mgr Michalina Bralewska jest pierwszym autorem, którego udział związany z przygotowaniem prac do druku oraz przeprowadzeniem i zaplanowaniem części eksperymentalnej, w przypadku prac oryginalnych, został oszacowany na co najmniej 78%.

Praca doktorska została wydana w formie maszynopisu liczącego 84 strony, z których pierwsze 28 stron stanowi syntetyczny opis głównych osiągnięć Pani mgr Bralewskiej zebranych w postaci streszczenia napisanego w języku polskim i angielskim, wykazu skrótów, spisu publikacji wchodzących w skład dysertacji, wstępu, prezentacji wyników prac wchodzących w skład osiągnięcia naukowego, podsumowania, bibliografii oraz wykazu publikacji których Pani mgr Bralewska jest współautorem, a które nie stanowiły podstawy do przygotowania rozprawy doktorskiej. Kolejne strony pracy obejmują pełnotekstowe publikacje wchodzące w skład opisywanego przez Doktorantkę cyklu oraz skany dokumentów wymagane do przedłożenia dysertacji.

Prezentowane prace są przygotowane z należytą starannością a wyniki w nich przedstawione mają zdecydowany wkład w rozwój dyscypliny naukowej jaką są nauki medyczne. Pani mgr Michalina Bralewska jako pierwsza na świecie wykazała, iż komórki trofoblastyczne pochodzące z pierwszego trymestru ciąży mają zdolność nie tylko do syntezy chromograniny A, ale również dysponują arsenalem enzymatycznym pozwalającym na przeprowadzanie cięcia tego białka do jego pochodnych peptydowych. Co więcej, w oparciu o samodzielnie zaproponowane modele *in vitro* zjawiska preeklampsji, Pani mgr Bralewska, wykazała iż chromogranino A pochodne peptydowe są wydzielane przez komórki trofoblastu do środowiska zewnątrzkomórkowego, w tym najprawdopodobniej do krwioobiegu matki. Te pochodne peptydowe, głównie katestatyna, mają zdolność do regulacji napięcia mięśniówki naczyń krwionośnych matki poprzez ich bezpośredni i pośredni wpływ na modulację funkcji śródbłonna, co przyczynia się do kontrolowania ciśnienia krwi.

Pani mgr Bralewska zaprezentowała wyniki przyjmując formę osoby pierwszej, co zdecydowanie poprawia odbiór pracy przez czytelnika. Pracę czyta się jak opowieść naukową na temat molekularnego mechanizmu zjawiska preeklampsji. We wstępie autorka zwięźle przedstawia aktualny, na okres pisania pracy, mechanizm rozwoju stanu przedrzucawkowego. Przedstawia białko - chromograninę A, oraz wskazuje na bezpośredni związek jej pochodnych

peptydowych z chorobami o podłożu sercowo-naczyniowym. Równocześnie Pani mgr Bralewska, podkreśla, iż według dostępnej wiedzy, komórki łożyska pochodzące z trzeciego trymestru ciąży niepowikłanej procesem patologicznym mają zdolność do syntezy chromograniny A, co, zdaniem Doktorantki, sugeruje, iż białko to może odgrywać rolę w prawidłowym przebiegu ciąży.

W oparciu o przeprowadzony przegląd literatury Pani mgr Bralewska postawiła hipotezę, iż nieprawidłowa produkcja chromograniny A i jej pochodnych peptydowych przez komórki łożyska może mieć znaczenie dla rozwoju zjawiska preeklampsji. Weryfikacja hipotezy wymagała przygotowania dwuetapowego eksperymentu. W pierwszym etapie Pani mgr Bralewska sprawdzała, czy istnieje różnica w ekspresji genu *CHGA* oraz jego produktu białkowego - chromograniny A pomiędzy tkanką łożyskową pozyskaną od kobiet, których ciąża przebiegała prawidłowo lub była powikłana stanem przedrzucawkowym. Prace eksperymentalne, zostały poszerzone dodatkowo o ocenę produkcji katestatyny, peptydu chromogranino A pochodnego, w komórkach łożysk kontrolnych i tych pobranych od kobiet ze zdiagnozowanym stanem przedrzucawkowym. Wyniki realizowanych eksperymentów zostały zaprezentowane i omówione w pracy oryginalnej zatytułowanej „*Chromogranin A demonstrates higher expression in preeclamptic placentas than in normal pregnancy*”.

W oparciu o zgromadzone dane Pani mgr Bralewska wykazała, że w preeklampsji, łożyskowa produkcja katestatyny jest obniżona przy jednoczesnym wzroście ekspresji genu *CHGA*. Ten znamieny wzrost ekspresji genu kodującego chromograninę A, jest zdaniem Doktorantki nieudolnym mechanizmem kompensacyjnym komórek łożyska do nasilenia produkcji białka którego enzymatyczne cięcie prowadzi m.in. do generacji katestatyny. Jednak, jak Pani mgr Bralewska słusznie zauważyła, uzyskane wyniki nie pozwalały na stwierdzenie czy nieprawidłowa ekspresja genu *CHGA* jest charakterystyczna także dla wczesnych etapów ciąży. Doktorantka, również zwróciła uwagę, iż materiał łożyskowy pozyskany od kobiet w czasie porodu nie pozwalał na weryfikację hipotezy, że komórki łożyska mimo zdolności do przeprowadzania enzymatycznego cięcia chromograniny A którego efektem jest m.in. katestatyna posiadają zdolność do uwalniania tego peptydu do przestrzeni pozakomórkowej, w tym do krwioobiegu matki. W wyniku potrzeby dostarczenia dostatecznych dowodów Pani mgr Bralewska samodzielnie przygotowała model *in vitro* zjawiska preeklampsji, wykorzystując do tego komercyjnie dostępne linie komórkowe HTR8/SVneo oraz BeWo. Model ten, stanowiący podstawę do przeprowadzenia drugiego etapu zaplanowanych prac eksperymentalnych, został opisany w kolejnej, wchodzącej w skład cyklu, pracy zatytułowanej:

„Reduction in CgA-Derived CST Protein Level in HTR-8/SVneo and BeWo Trophoblastic Cell Lines Caused by the Preeclamptic Environment”. Zastosowanie tak zróżnicowanych linii komórkowych, z których jedna prezentowała cechy komórek łożyska z I trymestru ciąży (linia HTR8/SVneo) a druga cechy komórek łożyska z III trymestru ciąży (linia BeWo) świadczy o doskonałym przygotowaniu merytorycznym oraz o szerokim spojrzeniu Doktorantki na patomechanizm zjawiska rozwoju preeklampsji, którego elementy krytyczne mogą pojawiać się na różnych etapach ciąży. Dodatkowo dobór warunków środowiskowych: hipoksja (2%O₂), stan zapalny (generowany przez IL6), stres oksydacyjny (generowany przez H₂O₂), które idealnie odzwierciedlają warunki w których bytują komórki łożyska w czasie ciąży powikłanej preeklampsją, świadczy iż Pani mgr Bralewska zadbała o najdrobniejsze detale pozwalające na uzyskanie wiarygodnych wyników w zakresie prowadzonych prac eksperymentalnych. Zaprezentowane w pracy oryginalnej wyniki po raz pierwszy na świecie wykazały, iż zarówno komórki trofoblastyczne prezentujące cechy komórek łożyska I i III trymestru ciąży mają zdolność do ekspresji genu *CHGA* oraz syntezy chromograniny A. Co więcej pionierskie badanie Doktorantki wykazało, iż trofoblastyczna sekrecja katestatyny do środowiska zewnątrzkomórkowego, w tym najprawdopodobniej do krwioobiegu matki, jest ściśle uzależniona od warunków środowiskowych jakie panują w otoczeniu komórek tworzących łożysko. Znamienny spadek stężenia uwalnianego peptydu, katestatyny, do przestrzeni pozakomórkowej był związany z hipoksją, nasilonym stanem zapalnym i stresem oksydacyjnym, czyli typowymi warunkami jakie panują w macicy kobiety, której ciąża powikłana jest stanem przedzucawkowym. Doktorantka, zwróciła również uwagę, iż taki patologiczny spadek uwalnianej katestatyny do środowiska zewnątrzkomórkowego, w tym najprawdopodobniej do krwioobiegu matki, może znacząco wpływać na obniżenie uwalniania tlenu azotu przez komórki śródbłonna matki, prowadząc tym samym do generacji nadciśnienia i pojawienia się objawów klinicznych stanu przedzucawkowego.

Podsumowując w mojej opinii Pani mgr Bralewska, przyczyniła się do poszerzenia wiedzy na temat patomechanizmu rozwoju stanu przedzucawkowego. Jako pierwsza na świecie wskazała na rolę białka chromograniny A będącej źródłem katestatyny w molekularnym mechanizmie rozwoju zjawiska preeklampsji. Zaplanowane i opisane w dysertacji prace eksperymentalne wskazują na ogromną wiedzę, zaangażowanie i determinację Pani mgr Michaliny Bralewskiej w uzyskanie wiarygodnych wyników, które mają niepodważalny wpływ na rozwój dyscypliny naukowej, co spełnia wymogi stawiane pracom doktorskim. O jakości i wartości przeprowadzonych eksperymentów świadczy również wysoki współczynnik IF czasopism, w których uzyskane wyniki zostały zaprezentowane.

Rozprawa na stopień naukowy doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu Pani mgr Michaliny Bralewskiej spełnia moim zdaniem warunki określone ustawą o stopniach naukowych i tytułach naukowych. W związku z powyższym wnoszę do Rady Nauk Medycznych Uniwersytetu Medycznego w Łodzi o dopuszczenie Pani mgr Michaliny Bralewskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Rzeszów, 19.08.2023.

Prof. dr hab. n. med. Tomasz Kluz
Specjalista ginekologii i położnictwa
Specjalista ginekologii onkologicznej
77 1 56 1 11 11
tel. 609 546 450
prof. dr hab. n. med. Tomasz Kluz