



Z-ca Przewodniczącej  
Rady Dyscypliny Nauki Medyczne

prof. dr hab. Tomasz Grzybowski

## UNIwersytet Medyczny w Białymstoku

Zakład Histologii i Cytofizjologii

15-222 Białystok, ul. Mickiewicza 2C

Tel. (85) 748-54-58

Białystok, 2025.01.02

Prof. dr hab. n. med. Irena Kasacka

### OCENA

Rozprawy doktorskiej mgr Klaudii Piekarskiej pt. „**Charakterystyka, mechanizm powstawania i funkcje biologiczne pęcherzyków zewnątrzkomórkowych w odpowiedzi zapalnej ludzkiego śródbłonna naczyń tętnic wieńcowych**” wykonanej pod kierunkiem Pani prof. dr hab. Aliny Grzanki w Katedrze Histologii i Embriologii Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy.

Recenzja została sporządzona w odpowiedzi na pismo dr hab. Iwony Sadowskiej-Krawczenko, prof. uczelni, Przewodniczącej Rady Dyscypliny Nauki Medyczne Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy z dnia 22.11.2024 r.

#### Ocena problematyki badawczej

Pęcherzyki zewnątrzwydzielnicze (ang. Extracellular Vesicles, EVs) są małymi cząsteczkami biologicznymi otoczonymi dwuwarstwową błoną lipidową, zawierającymi w swoim wnętrzu liczne biomolekuły, a na powierzchni posiadają swoiste markery. EVs wydzielane są przez praktycznie wszystkie typy komórek żywych organizmów, w tym ekzosomy, mikropęcherzyki i ciała apoptyczne. Obecność tych struktur można stwierdzić we wszystkich płynach ustrojowych (we krwi, moczu, nasieniu, ślinie, płynie owodniowym, mleku kobiecym itd.) i w macierzy międzykomórkowej.

EVs wykazują funkcję przekazywania informacji między komórkami w procesach biologicznych, takich jak proliferacja komórek i apoptoza, krzepnięcie krwi, regulacja naczyniowa czy stan zapalny.

Obecne na powierzchni EVs różne białka receptorowe mogą specyficznie oddziaływać na określone komórki docelowe znajdujące się w sąsiedztwie, a także w odległych tkankach, przekazując im złożoną informację. Zawartość EVs składa się z różnych substancji biologicznych: kwasów nukleinowych w tym mikroRNA, białek, lipidów i metabolitów.

Transportując różne substancje do komórek docelowych, EVs stanowią istotny element komunikacji międzykomórkowej. Mogą wywierać korzystny, neutralny lub szkodliwy wpływ na komórki biorcy, poprzez modulację ekspresji genów, wpływając na fenotyp komórek i oddziałując na szlaki molekularne.

Gromadzące się w ostatniej dekadzie dowody wykazały, że pęcherzyki zewnątrzkomórkowe odgrywają istotną rolę w utrzymaniu prawidłowej struktury i funkcji serca w warunkach fizjologicznych, a w stanach patologicznych zmieniają swój skład, co sprzyja rozwojowi chorób układu krwionośnego. Wykazano również ogromny potencjał EVs do monitorowania i ewentualnie leczenia chorób układu krążenia, ponieważ odgrywają one kluczową rolę w mediacji reakcji zapalnych i krzepnięcia z udziałem różnych komórek zapalnych, przyczyniając się do rozwoju miażdżycy i angiogenezy. Jednak wciąż brakuje szczegółowej wiedzy na temat funkcji pęcherzyków zewnątrzkomórkowych, aby można je było wykorzystać w leczeniu różnych chorób układu sercowo-naczyniowego.

Mając na względzie utrzymującą się na całym świecie wysoką zapadalność i śmiertelność wciąż istnieje potrzeba opracowania nowych strategii zapobiegania i leczenia różnych chorób układu krążenia, w których dochodzi do uszkodzenia komórek śródbłonka naczyniowego, kardiomiocytów i innych komórek.

Ten właśnie kierunek obrała Doktorantka, która w swojej dysertacji dowodzi, że wybrane czynniki procesu zapalnego modyfikują funkcje śródbłonka, wpływając na migracje

komórek oraz formowanie się pęcherzyków zewnątrzkomórkowych pochodzenia śródbłonkowego i ich funkcji w komunikacji międzykomórkowej.

Zgodnie z tytułem rozprawy, celem części eksperymentalnej pracy była ocena zdolności do formowania się pęcherzyków zewnątrzkomórkowych pochodzenia śródbłonkowego w warunkach prozapalnych, wyjaśnienie mechanizmu ich powstawania, a także określenie funkcji biologicznych EVs w kontekście formowania nowych naczyń krwionośnych, bądź przebudowy już istniejących.

Oryginalność tematyki badań i potencjalny wkład w sferze aplikacji wyników badań własnych Doktorantki oceniam bardzo pozytywnie. Moja wysoka ocena recenzowanej pracy wynika również z faktu, iż jest ona dopełnieniem rozpoczętego przed laty etapu badań Doktorantki i stanowi punkt wyjściowy kontynuacji pracy naukowej w przyszłości.

Jednocześnie kieruję słowa uznania i szacunku do Zespołu kierowanego przez Panią Profesor Alinę Grzankę, który rozwija niekwestionowane nowatorskie dokonania naukowe i osiągnięcia w postaci dobrze opracowanych rozpraw doktorskich.

Dysertację rozpoczyna informacja o źródłach finansowania, obszerny wykaz skrótów i wykaz publikacji, stanowiących podstawę postępowania o nadanie stopnia naukowego doktora.

Przedstawiona do recenzji praca doktorska Pani mgr Klaudii Piekarskiej została przygotowana na podstawie czterech artykułów opublikowanych w renomowanych czasopismach, o łącznym wskaźniku oddziaływania (Impact Factor) wynoszącym 9,5 i liczbie punktów MNiSW – 440. 3 prace oryginalne – 1) Maciej Gagat, Wioletta Zielińska, **Klaudia Mikołajczyk**, Jan Zabrzyński, Adrian Krajewski, Anna Klimaszewska-Wiśniewska, Dariusz Grzanka, Alina Grzanka. CRISPR-Based Activation of Endogenous Expression of *TPM1* Inhibits Inflammatory Response of Primary Human Coronary Artery Endothelial and Smooth Muscle Cells Induced by Recombinant Human Tumor Necrosis Factor  $\alpha$ . *Front Cell Dev Biol.* 2021 (IF 4,6, MEiN 100), 2) **Klaudia Mikołajczyk**, Dominika Spyt, Wioletta Zielińska,

Agnieszka Żuryń, Inaz Faisal, Murtaz Qamar, Piotr Świniarski, Alina Grzanka, Maciej Gagat. The Important Role of Endothelium and Extracellular Vesicles in the Cellular Mechanism of Aortic Aneurysm Formation. *Int J Mol Sci* 2021 (IF 4,6, MEiN 100), 3) oraz jedna praca przeglądowa – **Klaudia Piekarska**, Dominika Spyt, Klaudia Bonowicz, Dominika Jerka, Alina Grzanka, Maciej Gagat. Antiangiogenic effects in the modulation of inflammatory pathways. A comprehensive analysis of potential therapeutic substances. *Medical Research Journal* DOI:10.5603/mrj.101851 (MEiN 100). W trzech pracach Doktorantka jest pierwszym autorem, a jej udział w przygotowanie artykułów był zasadniczy, co potwierdzają załączone oświadczenia współautorów.

Każda z tych publikacji była oceniona przez kompetentnych ekspertów, więc moja rola korecenzenta ogranicza się do oceny strony formalnej opracowania.

Publikacje stanowiące podstawę dysertacji są spójne i szczegółowo opracowane, a w komentarzach do artykułów, Doktorantka logicznie i wyczerpująco przedstawia ich omówienie.

Pani mgr Klaudia Piekarska zaplanowała i przeprowadziła poszczególne etapy badań w sposób logiczny i zasadny, aby omawiane oddzielnie w 4 pracach problemy stanowiły dopełniającą się całość. Szczegółowo opisany przez Doktorantkę warsztat metodyczny oraz wyniki własnych badań stanowią, w mojej ocenie, ogromne znaczenie nie tylko poznawcze, ale również mogą przyczynić się do opracowania nowych strategii leczenia chorób sercowo-naczyniowych. Dlatego też wybór tematu pracy doktorskiej oraz szeroki zakres wykonanych badań uważam za wyjątkowo zasadny, aktualny oraz bardzo ważny w aspekcie klinicznym.

W skład rozprawy, poza wspomnianymi publikacjami wchodzi opis imponującego dorobku naukowego i aktywności naukowej (czynny udział w projektach naukowych, autorstwo i współautorstwo publikacji o łącznym współczynniku oddziaływania 47,131 i 1610 punktów MEiN, 70 doniesień konferencyjnych, staż zagraniczny), kilkustronicowe Wprowadzenie, po którym wyczerpująco przedstawione zostały „Założenia i cele pracy”,

a także Komentarze do publikacji składających się na pracę doktorską. W kolejnym rozdziale przedstawionych zostało 6 wniosków. Rozprawa zawiera także „Piśmiennictwo” (157 pozycji) i streszczenia w języku polskim i angielskim. Na końcu, jako kolejne rozdziały, przedstawiono „Załączniki” w tym kopie artykułów, sformatowanych przez Redakcję czasopism (55 stron), Oświadczenia współautorów o ich udziale w powstawaniu publikacji przedstawionych jako Dysertacja i Zgoda Komisji Bioetycznej na przeprowadzenie zaplanowanych badań.

Taki układ pracy doktorskiej jest ułatwieniem w przygotowaniu oceny dysertacji.

We Wprowadzeniu Doktorantka prezentuje stan wiedzy na temat EVs, opisuje istotność komunikacji międzykomórkowej w utrzymaniu homeostazy organizmu i zmiany patologiczne w układzie sercowo-naczyniowym wywołane zaburzeniami tej komunikacji. Na przykładzie miażdżycy omawia dysfunkcję śródbłonka naczyniowego, mechanizm komunikacji międzykomórkowej za pośrednictwem nadmiernie produkowanych pęcherzyków zewnątrzkomórkowych, jako specyficznych markerów inicjacji stanu zapalnego. Następnie omówione są dokładnie funkcje komórek śródbłonka głównie w kontekście transdukcji sygnału i indukcji ścieżek komunikacji międzykomórkowej związanych z procesem migracji komórek. W ostatniej części wprowadzenia Pani magister opisuje pęcherzyki zewnątrzkomórkowe (migrasomy) i ich związek z odpowiedzią komórek odpornościowych podczas indukcji miażdżycy – jednej z najczęstszych chorób sercowo-naczyniowych. Być może dokładna analiza biosyntezy EVs i zrozumienie mechanizmu ich powstawania mogą przyczynić się do poprawy diagnostyki i terapii chorób sercowo-naczyniowych, co w pełni uzasadnia obszar poszukiwań Doktorantki.

W oparciu o przesłanki zawarte we Wprowadzeniu Autorka ocenianej rozprawy logicznie zredagowała rozdział „Założenia i cele” kolejnych etapów badań, które zostały przedstawione bardzo konkretnie i czytelnie w artykułach stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej.

W tym miejscu mojej recenzji chciałabym podkreślić poprawność i klarowność sformułowania założeń i celów badawczych, prowadzących jednoznacznie do realizacji przyjętej hipotezy.

Kolejny rozdział zatytułowany „Komentarze do publikacji” wchodzących w skład cyklu stanowiącego podstawę do nadania stopnia doktora Doktorantka przedstawia obecny stan wiedzy w zakresie charakterystyki procesu zapalnego w śródbłonku naczyń prowadzącego do przebudowy ściany naczyń (praca przeglądowa) oraz wyniki własnych badań prezentowane w 3 artykułach oryginalnych, które zostały poddane wnikliwej ocenie przez kompetentnych recenzentów podczas publikacji ww. prac.

Należy stwierdzić, że sposób zaplanowania badań i ich realizacja świadczą o dobrym przygotowaniu merytorycznym Doktorantki.

Na podstawie przeprowadzonych badań Autorka sformułowała 6 wniosków, które wynikają bezpośrednio z analizy rezultatów uzyskanych w czasie realizacji badań.

### **Wnioski końcowe**

W podsumowaniu mojej oceny pragnę podkreślić, że podstawę Dysertacji stanowią cztery wartościowe artykuły. Przygotowanie pracy przeglądowej wskazuje na przygotowanie teoretyczne Doktorantki do przeprowadzenia badań i analizy uzyskanych wyników. A uzyskane wyniki stanowią oryginalne rozwiązanie problemu naukowego i wskazują na dobre opanowanie niełatwego warsztatu badawczego. Dodatkowo należy podkreślić bardzo dużą aktywność naukową Pani mgr Klaudii Piekarskiej, która jest współautorką 17 publikacji opublikowanych w indeksowanych w bazie Journal Citation Report.

Mając na uwadze aktualność i znaczenie tematyki badawczej, sformułowane założenia i cele badawcze, walory poznawcze i w perspektywie aplikacyjne z pełnym przekonaniem stwierdzam, że praca stanowi znaczący dorobek z elementami nowości naukowych i w pełni odpowiada wymogom do nadania stopnia doktora nauk medycznych w dyscyplinie nauki medyczne, zawartym w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2023 poz. 742), wnioskuję do Wysokiego Senatu Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy o nadanie mgr Klaudii Piekarskiej stopnia doktora nauk medycznych.

Ponadto, ze względu na bardzo wysoki poziom merytoryczny pracy, doceniony również przez ekspertów międzynarodowych, zasługuje na wyróżnienie, o co z całym przekonaniem wnioskuję.

**KIEROWNIK**  
Zakładu Histologii i Cytofizjologii  
*prof. dr hab. Irena Kasacka*