

Prof. dr hab. Ryszard Bobowiec
Zakład Patofizjologii
Katedra Przedklinicznych Nauk Weterynaryjnych
Wydział Medycyny Weterynaryjnej UP
20-033 Lublin
ul. Akademicka 12
e-mail: ryszard.bobowiec@up.lublin.pl

Lublin, 2019-10-04.

Recenzja rozprawy doktorskiej **mgr Katarzyny Kornickiej-Garbowskiej** pt.: „*Modulacja metabolizmu i dynamiki mitochondriów oraz metylacji DNA komórek progenitorowych tkanki tłuszczowej izolowanych od koni z syndromem metabolicznym z wykorzystaniem resweratrolu i 5-azacytydyny*”

To wspaniale oceniać dobrą pracę w dniach, gdy po raz pierwszy światowe źródła naukowe (Nature, 03 Sept. 2019) podały informację o skuteczności transplantacji rogowki, otrzymanej w wyniku reprogramowania dojrzałych komórek skóry dawcy do stanu embrionalnego. Wprawdzie przekonujące wyniki Doktorantki nie zostały jeszcze uwiarygodnione w badaniach *in vivo* u koni, ale w przedłożonej pracy przedstawiono mechanistyczne uzasadnienie aplikacyjności mezenchymalnych komórek macierzystych (MSC) podskórnej tkanki tłuszczowej koni. O ile zdrowa tkanka tłuszczowa wydziela szereg wazoaktywnych adipokin i przeciw-zapalnych cytokin, o tyle tkanka zmieniona chorobowo, jak np. w przebiegu końskiego syndromu metabolicznego (EMS), zmienia profil sekrecyjny przyczyniający się do patogenezy np. syndromu metabolicznego. Uchwyciła to Doktorantka i bardzo trafnie zajęła się poznaniem mechanizmów umożliwiających ewentualną korekcję zaburzonej funkcji adipocytów, tak aby przywrócić ich potencjał naprawczy.

Praca wychodzi naprzeciw wyzwaniom stojącym przed medycyną regeneracyjną, stającą się atrakcyjną opcją terapeutyczną, która rewolucjonizuje leczenie. W przeciwieństwie do niższych wielokomórkowców, posiadających wyjątkowo wysokie zdolności regeneracyjne, regeneracja u ssaków, w tym u koni jest albo znikoma albo zaniechana. Tak więc poznanie homeostazy tkankowej i naprawy pourazowej zwróciło uwagę na możliwy potencjał regeneracyjny zakodowany głównie w istniejących praktycznie we wszystkich tkankach komórkach macierzystych. Uruchomienie zdolności regeneracyjnych w różnych tkankach staje się możliwe przez poznanie molekularnych mechanizmów kontrolujących regenerację, a zwłaszcza czynników, które ograniczają regenerację, w tym natury immunologicznej, związanej z podścieliskiem zewnątrzkomórkowym, starzeniem, adaptacją fizjologiczną, zdolnością do angiogenezy i neurogenezy. Reaktywacja latentnych odpowiedzi regeneracyjnych u dorosłych lub starych osobników daje nadzieję na nowe, bardziej naturalne sposoby łagodzenia choroby lub przywracania zdrowia. W tym względzie prowokacyjnie wypowiedział się w swoim opracowaniu *Principles of regeneration* w 1969 r. Goss R., który odnotował „to jest oczywiste, że struktury niezbędne do przeżycia nie mogą się regenerować”. Dzisiaj mamy przykłady pełnej regeneracji struktur złożonych, które funkcjonują przez długie lata życia zaczynając od najprostszej, wspólnej dla różnych gatunków formy regeneracji, jaką jest reepitelializacja, czy podniesiona regulacja genów odpowiedzi immunologicznej. Regeneracja odnosi się również do regularnie powtarzanej odnowy szczególnych struktur lub tkanek w ciągu całego życia.

Doktorantka zogniskowała swoje badania na jednej z metod medycyny regeneracyjnej u koni, zmierzającej do wykorzystania funkcji immunomodulacyjnych i zapalnych MSCs u koni dotkniętych EMS. Znaczne zainteresowanie tymi komórkami wynika z łatwości ich dostępu, prostoty izolacji, własności regeneracyjnych przy ograniczeniu bliznowacenia oraz z powodu niewielkiej ekspresji cząsteczek II klasy MHC, małej immunogenności, umożliwiającej terapię allogeniczną, a co najważniejsze zdolności modulowania odpowiedzi immunologicznych i zapalnych. Adipocytarne komórki macierzyste mogą, po zastosowaniu właściwego bodźca, różnicować się nawet do odmiennych pochodzeniowo linii komórkowych np. w kierunku kardiomiocytów, z tworzeniem miotub, wówczas gdy półpłynne metylcelulozowe podłoże jest wzbogacone w odpowiednie cytokiny.

Niebagatelne w dobie obecnej jest również ominięcie problemu etycznego, który podnoszony jest w przypadku wykorzystywania pluripotencjalnych komórek embrionalnych (zwłaszcza u ludzi). W tym momencie można wspomnieć o tzw. indukowanych embrionalnych pluripotencjalnych komórkach macierzystych (iPSCs), także u koni, otrzymywanych technologią transgeniczną z reprogramowaniem dorosłych tkanek.

Przedłożona do oceny dysertacja odzwierciedla wieloletni, zespołowy wysiłek badawczy, którego część jest zamieszczona w przedstawionej do oceny rozprawie obejmującej 5 anglojęzycznych prac w tym 4 badawczych. We wszystkich pracach nowatorskim podejściem badawczym było dążenie do modyfikowania adipocytarnych komórek macierzystych koni dotkniętych syndromem metabolicznym (ASC-EMS) (*adipose derived mesenchymal stem cells derived from equine metabolic syndrome*), tak aby przywrócić im macierzystość, odwrócić proces komórkowego starzenia. Doktorantka opanowała i posługiwała się do oceny morfologii adipocytarnych komórek macierzystych, mitochondriów oraz autofagosomów nowoczesnymi metodami mikroskopii konfokalnej, elektronowej (TEM), mikroskopii zogniskowanej wiązki jonowej, z kolei do oceny ekspresji powierzchniowych białek, potencjału błon mitochondrialnych stosowała wiarygodną metodę cytometrii przepływowej, do oceny stresu oksydacyjnego wykorzystała zmiany w aktywności SOD, stężenia NO, starzenie komórek oceniała metodą histochemiczną, ekspresję na poziomie genomowym badała uznaną techniką RT-PCR tj. Real-time reverse transcription polymerase chain reaction, ekspresję na poziomie białka metodą Western-blotting z wykorzystaniem SDS-PAGE.

Ogólna ocena dysertacji:

Pracę przygotowano przejrzysto, systematycznie i w sposób zwarty. Analizę założeń pracy, stosowanych metod oraz osiągniętych wyników, znacznie ułatwia skrupulatnie przedstawiony spis treści, wykaz skrótów (z potknięciami językowymi) oraz anglojęzyczny abstrakt i polskie streszczenie. Temat pracy polegający na ocenie *modulacji metabolizmu i dynamiki mitochondriów oraz metylacji DNA komórek progenitorowych tkanki tłuszczowej izolowanych od koni z syndromem metabolicznym z wykorzystaniem rezweratrolu i 5-azacytydyny* został zrealizowany, można jedynie zachęcać do dalszych przedsięwzięć, tak aby wykorzystać osiągnięte wyniki w terapii komórkowej w przebiegu EMS u koni. Pewnym odzwierciedleniem ich przydatności mogła być odpowiedź mononuklearnych komórek krwi, makrofagów i limfocytów T_{Reg} w obecności ASC-EMS stymulowanych AZA/RES. Spośród przytoczonych 5 prac, cztery były to prace eksperymentalne przeprowadzone w warunkach *in vitro*, a piątą końcową, bardzo słusznie włączono, jako przeglądową, podsumowującą zdobyte doświadczenia. Okazałe przedstawiają się wskaźniki bibliometryczne publikowanych prac. Wszystkie artykuły ukazały się w czasopismach zagranicznych posiadających IF > 4,5, tak więc ich sumaryczny IF = 24,569. Uzasadnia to w pełni moje przekonanie, że Doktorantka osiągnęła stopień rozwoju badawczego nie tylko konieczny do uzyskania pierwszego stopnia naukowego, ale również adekwatny do uznania Jej za specjalistę w zakresie oceny przydatności wybranych komórek macierzystych do ich aplikacyjności w praktyce.

We wstępie dużo uwagi poświęcono medycynie regeneracyjnej, mezenchymalnym komórkom macierzystym, syndromowi metabolicznemu, użyteczności w odmładzaniu komórek rapamycyny, przeciwutleniaczy, bFGF, i wreszcie badanej kombinacji 5-azacytydyny (AZA) i resweratrolu (RES), natomiast pominięto przybliżenie rozbudowanej strony analitycznej, decydującej o osiągniętych wynikach.

Ocena 4 prac doświadczalnych:

W pierwszej pracy, opublikowanej w 2018 r. w J Cell Mol Med., Autorka mając 45% udział jako pierwszy spośród czterech współautorów, udowadnia proliferacyjny, antyapoptotyczny i wydłużający przeżywalność ASC-EMS wpływ AZA i RES. EMS został wiarygodnie, wszechstronnie uzasadniony w oparciu o wyznaczone wartości masy ciała, kondycji konia, występowania przetrwałego ochwatu, spoczynkowego poziomu insuliny, stężenia glukozy we krwi, połączonego testu glukoza-insulina i stężenia leptyny. Do badań użyto podskórnej tkanki tłuszczowej pobranej u nasady ogona od 15 osobników dotkniętych EMS i 15 kontrolnych. Tożsamość mezenchymalnego pochodzenia komórek ustalano w oparciu

o obecność lub brak 3 markerowych antygenów CD44, CD45 i CD90 rozpoznawanych przez specyficzne przeciwciała. Indukowano różnicowanie ASC w kierunku adipogennym w przeciągu 14 dni, a osteogennym i chondrogennym w ciągu 21 dni. Do oceny różnicowania wieloliniowego użyto wiarygodnych komórkowych metod barwnych wykorzystując safraninę O wybarwiająca proteoglikany chondrogennych komórek na kolor brązowy, czerwieni olejowej O wybarwiającej kropelki tłuszczu linii adipocytów na kolor szary oraz czerwieni alizarynowej do wybarwiania zmineralizowanego podścieliska podczas osteogenezy. Trafnie dobrano stosowane czynniki stymulacyjne, opierając się na danych mówiących, że AZA, wiąże się z DNA i hamuje metylację specyficznych regionów genowych, a resweratrol wywiera wpływ immunomodulujący, przeciwwzapalny i antyoksydacyjny. Jak przystało na pracę wysokiej klasy, wyniki uwiarygodnia 8 wielopostaciowych rycin, z których każda klarownie prezentuje np. analizy cytometryczne, ekspresję cząsteczek markerowych CD90 i CD44 i brak ekspresji CD45, jako markera komórek hematopoetycznych, czy też wskaźniki multipotencjalnego różnicowania w kierunku trzech typów komórek wybarwiających się specyficznymi wspomnianymi barwnikami. Ze względu na własne zainteresowania bardzo przekonały mnie m.in. analizy sekrecyjnych mikropęcherzyków (MV) wydzielanych przez ASC, które obok badanych przez Doktorantkę składników mogą np. zawierać w swoim składzie oscylacyjne poziomy tzw. czynnika antysekrecyjnego (AF), decydującego o osobniczej oporności na biegunki. We własnych badaniach Doktorantka wyraźnie zobrazowała korzystne efekty wprowadzenia kombinacji AZA/RES do podłoża hodowanych komórek ASC koni dotkniętych EMS. Wyrażały się one zwiększeniem sekrecji MVs i nasileniem tworzenia wypustek cytoplazmatycznych tzw. filipodiów, rosła także proliferacja komórek mierzona intensywnością wybarwiania antygeny anty jądrowego Ki67, wykazano również pobudzające działanie na potencjał klonogenny komórek. Szkoda tylko że zmiany proliferacyjne wyznaczono w jednostkach względnych tj. w procentach, zamiast w bezwzględnych jednostkach podając zmiany liczby komórek lub kolonii. Wychodząc z założenia, że aktywacja ścieżki apoptozy następuje wówczas, gdy dochodzi do rozszczepienia mitochondriów i obniżenia potencjału błonowego mitochondriów (MMP) wszechstronnie oceniono te energetyczne siłownie komórki pod wpływem AZA/RES. Poprawa stanu mitochondriów wyrażona obniżeniem poziomu ROS, poziomu mir-24, odwróceniem depolaryzacji MMP, wzrostem enzymów SOD, odwróceniem zmian ultrastrukturalnych, a także łagodzeniem podziału mitochondriów i mitofagii, zostały dobrze udokumentowane pomiarami cytometrycznymi, ultrastrukturalnymi i molekularnymi. Autorka mechanistycznie zademonstrowała, że AZA i RES mają zdolność rejuwenacji adipocytarnych komórek macierzystych koni dotkniętych syndromem metabolicznym (ASCEMS). Odpowiednio hamując metylację DNA i działając antyoksydacyjnie, aktywują dynamikę mitochondriów, promując raczej ich fuzję, a nie rozpad, zwiększają ponadto tempo proliferacji, tłumiąc proces programowanej śmierci komórek i starzenia w efekcie łagodzą dysfunkcje patologiczne, wynikające z EMC. W sumie wychodząc z założenia, że EMS narusza funkcjonalność ASC Autorka przytoczonymi powyżej analizami unaoczniała możliwość powstrzymywania, a nawet odwracania zmian wstecznych w ASC przez stosowane związki (AZA/RES), co zwiększa ich potencjalną terapeutyczną użyteczność w układach autogenicznych. Ujawniła szczególnie dynamiczne działanie AZA/RES na funkcje mitochondriów, wynikające z działania antyoksydacyjnego. Słusznie wybrano dwa mniejsze stężenia RES (0,05 – 5 μM), mając na uwadze niekorzystne apoptotyczne działanie tego flawonoidu przy wyższych stężeniach. Oryginalnie wykazała, przecząc wcześniej publikowanym wynikom, hamowanie przez RES autofagii wyrażające się obniżeniem ekspresji autofagowych genów (bekliny, p62 i LAMP2). Hamowanie autofagii przez RES wg Autorki odzwierciedla rejuwencję komórek ASCEMS i poprawę statusu metabolicznego komórek, co jest mechanizmem protekcyjnym przed uszkodzeniami oksydacyjnymi i usuwaniem mitochondriów. Dalszym potwierdzeniem korzystnego, odmładzającego działania kombinacji AZA/RES było zwrócenie uwagi na obniżanie stresu siateczki endoplazmatycznej co ujawniła regulacją w dół dwóch stresowych genów siateczki (tj. PERK -kinaza siateczki endoplazmatycznej zbliżona do PRKR i CHOP- 3 transkrypt indukowany uszkodzeniem DNA). Zmiany powodowane przez AZA/RES wyrażały się również na poziomie epigenetycznym w postaci obniżenia wbudowywania 5-metylcytosyny do DNA oraz promocją demetylacji wyrażoną podniesioną ekspresją dioksygenaz metyl cytozyny TET 2 i 3. Z przeprowadzonych badań wynika bardziej uniwersalne wskazanie na użyteczność kombinacji AZA/RES w korygowaniu dysfunkcji komórek

macierzystych w ogóle i ich rejuwenacji gwarantującej poprawę potencjału terapeutycznego. Na podkreślenie doniosłości tej pracy wskazują wcześniej opublikowane prace z tego zakresu zwłaszcza zaś zrealizowany grant NCN nr 2016/21/B/NZ7/01111.

- uwagi

- podskórna tkanka tłuszczowa nie jest homogenna. Należało zwrócić uwagę na proces tzw. brązowienia „browning” białej tkanki tłuszczowej tj. przybliżyć mechanizmy promujące zmianę fenotypową z przesunięciem białych adipocytów do przypominających brązowe-beżowe, charakteryzujące się rozpraszaniem energii i termogennością. Należało także wziąć pod uwagę adipocyty okołonaczyniowe (PVAT), które zależnie od okolicy, są uważane za narząd endokryny uwalniający szerokie spektrum biologicznie aktywnych cząsteczek (dysfunkcyjne PVAT uwalniają czynniki skurczowe: prostaglandyny, angiotensynę II, chemerinę, adrenalinę);

-badano wpływ stałej dawki AZA (0,5 μ M), a nie dwóch odmiennych stężeń, jak podano w wynikach, zmienne dawki dotyczyły RES (0,05 i 5 μ M).

W drugiej pracy Doktorantka mając również 45% udział, opublikowanej w tym samym renomowanym czasopiśmie J Cell Mol Med. i we współautorstwie z praktykiem szwajcarskim, rozszerza dane odnośnie korzystnego działania kombinacji AZA/RES na MSC pochodzące od koni dotkniętych EMS, tym razem w odniesieniu do poprawy ich różnicowania w kierunku osteogennym. Do badań posłużono się izolowanymi komórkami ASC pochodzącymi od starszych koni w wieku około 11,2 lat (zakres wiekowy 9-14 lat), z których konie dotknięte EMS wykazywały siedmiokrotnie podwyższony poziom insuliny i dwukrotnie podwyższone stężenie leptyny oraz stosunku połączonego testu glukozy- insulinowego do glukozy. Techniki stosowane do oceny morfologicznej komórek (elektronowa mikroskopia transmisyjna i skaningowa, ogniskowanego strumienia jonowego oraz konfokalna) zostały należycie przybliżone. Pomiarów aktywności fosfatazy alkalicznej, stężenia tlenu azotu, aktywności SOD, oceny starzenia komórek w oparciu o obecność w komórkach β -galaktozydazy, oceny potencjału błonowego mitochondriów, a także stężenia TNF α dokonywano przy użyciu uznanych zestawów komercyjnych. Do oceny ekspresji badanych genów i białek posłużono się precyzyjnymi metodami RT-PCR dysponując odpowiednimi primerami oraz western blottingiem. Tak jak w poprzedniej pracy obecność antygenów CD44 i CD90 oraz brak CD45 słusznie uznawano jako markerowe wskaźniki obecności w podłożu ASC. Z kolei wybarwienie safraniną, czerwienią alizarynową i czerwienią olejową wskazywało na wielokierunkowe różnicowanie ASC do linii chondrogennej, osteogennej i adipogennej.

Zalety pracy:

- praca udokumentowana jest wszechstronnymi 12 rycinami (obrazującymi immunofenotypowanie, multipotencjalność, tempo proliferacji, ocenę osteogenezy, mineralizację podścieliska, ocenę stresu oksydacyjnego, badanie apoptozy i starzenia, narastanie stresu siateczki endoplazmatycznej oraz zmiany autofagii podczas różnicowania osteogennego, dynamikę mitochondriów i mitofagii, działanie na status aktywacyjny makrofagów i w końcu odchylenia w efektach epigenetycznych podczas różnicowania osteogennego ASC pochodzących od zdrowych koni, dotkniętych EMS i koni dotkniętych poddanych działaniu AZA/RES);

- tempo proliferacji mierzono dwoma sposobami czasem podwojenia populacji (PDT) i tempem syntezy DNA na podstawie wbudowywania BrdU do komórkowego DNA;

- oceny zmian morfologicznych komórek dokonywano 3-ma metodami mikroskopii elektronowej: skaningowej (SEM), transmisyjnej (TEM) i ze zogniskowaną wiązką jonową (FIB-SEM)

- wykazano zwiększoną ekspresję genów związanych z osteogenezą tj. mRNA dla 2 czynnika transkrypcyjnego związanego z RUNT (RUNX 2) i kolagenu, zwiększoną mineralizację podścieliska, podniesioną aktywność SOD również MMP-mitochondrialny potencjał błonowy, narastającą żywotność zarówno komórek ASCEMS potwierdzoną obniżeniem transkryptów mRNA p21, Cas-3 i Cas-9, jak i po potraktowaniu ASCEMS kombinacją AZA/RES;

- przybliżono znaczenie obniżania przez AZA/RES 5-metylocysteiny (5-mC) oraz 1 metyltransferazy DNA (DNMT1). W ten sposób zahamowana metylacja DNA okazuje się poprawiać różnicowanie osteogenne.

Doktorantka rozszerza w ten sposób dalszą przydatność wprowadzanych związków (AZA/RES), które jak udowodniła we wcześniejszej pracy, są w stanie hamować, a nawet odwrócić starzejący się fenotyp ASC;

- nie mniej doniosłym osiągnięciem Doktorantki jest wykazanie wzmożonej mitofagii, procesu zmierzającego do jakościowej kontroli mitochondriów. Ekspozycja ASCEMS na AZA/RES w badaniach Doktorantki zwiększała ekspresję kinazy mitochondrialnej (PINK1) i ligazy ubikwitynowej, w efekcie dochodziło do usuwania uszkodzonych mitochondriów (mitofagii), co wiązało się z nasilonym różnicowaniem osteogennym. Powyższe wyniki są dalszym potwierdzeniem słuszności wprowadzenia ocenianej kombinacji AZA/RES dla poprawy przeżywalności i różnicowania w kierunku osteogennym końskich ASC ;

- w omówieniu wyników szeroko konfrontowała osiągnięte rezultaty z wynikami uznanych autorów. Dla przykładu przytacza Kao, który wskazywał, tak jak Oceniana, na promujące osteogenezę własności RES. Podobnie Zhang, który dostrzegł, że stres siateczki endoplazmatycznej jest konieczny do osteogenezy zależnej od BMP. W badaniach Doktorantki zwiększona ekspresja 3-go transkryptu indukowanego uszkodzeniem DNA (CHOP) oraz kinazy siateczki endoplazmatycznej zbliżonej do PRKR (PERK) w obecności AZA/RES właśnie odzwierciedla odchylenia w czynności siateczki endoplazma tycznej. Z kolei regulacja w górę mitofuzyny (MFN) z obniżeniem ekspresji 1 cząsteczki rozszczepiającej mitochondriom (FIS) są dowodem na fuzję mitochondriów pod wpływem kombinacyjnego działania AZA/RES.

Uwagi:

- Pomyłone skróty raz mitofuzynę określa skrót MNF (opis Fig. 9 oraz powtarzany w dyskusji), natomiast Fig. 9C i D podaje skrót MFN-1!

- (ryc. 2 C) ponieważ podczas różnicowania osteogennego tempo proliferacji stopniowo narastało po 1 i 5 dniu zarówno w komórkach ASC pochodzących od koni dotkniętych EMS, jak i w komórkach EMS z dodatkiem AZA/RES należało ocenić proliferację w dłuższym okresie czasu aby przedstawić pełną dynamikę odpowiedzi proliferacyjnej;

- stwierdzenia podane w rozdziale dotyczącym wyników, akapit 3.2 są niespójne z danymi przedstawionymi na ryc. 2B, W drugim zdaniu tego akapitu podano „ W kontrolnym podłożu, po 24 h propagacji w obecności AZA/RES tempo proliferacji istotnie rosło w porównaniu do komórek nie traktowanych Fig. 2A, $P > 0,001$; i to jest prawda. W następnym zdaniu podano, że te wyniki są dalej wsparte analizą PDT (population doubling time). ASCEMS okazywały zwiększone PDT, podczas gdy w grupie eksperymentalnej (EMSAZA/RES), czas potrzebny do podwojenia liczby komórek był zmniejszony i porównywalny do kontroli, zdrowych komórek, a więc to zdanie nie wspiera pierwszego!

Trzecia praca współautorska, podobnie jak w poprzednich z 45% udziałem Doktorantki, jest kontynuacją dociekań nt. użyteczności dwóch wcześniej ocenianych związków AZA/RES, ale tym razem w odniesieniu do ich pobudzającego działania na ASCs koni dotkniętych EMS w kierunku różnicowania do linii chondrogennej. Materiał do badań (ASCs) pochodził od tych samych co w poprzedniej pracy 11,2 letnich koni obojga płci kwalifikowanych albo do grupy kontrolnej albo badawczej w oparciu o pomiar spoczynkowego poziomu insuliny, leptyny, połączonego testu glukozo-insulinowego oraz specyficznym w oparciu o badanie Rtg puszki kopytowej. Osiągnięte wyniki odnośnie chondrogennego różnicowania udokumentowano podwójnie w formie opisowej i ilustracyjnej zawierającej 11 rozbudowanych rycin. Zobrazowano na nich cytometryczną ekspresję powierzchniowych antygenów, efektywność chondrogennego różnicowania, ocenę apoptozy, szacowania stresu siateczki endoplazma tycznej, ocenę autofagii, przedstawiono typy sieci mitochondrialnej, dynamiki mitofagii mitochondrialnej, wyniki oznaczania odchyleń epigenetycznych ze znamionym obniżeniem 5-metylcytozyny w komórkach potraktowanych AZA/RES oraz zwiększeniem ekspresji dioksygenaz metyl cytozyny TET-2, a zwłaszcza TET-3 oraz finalnie graficznie przedstawiono istotne obniżenie arginazy-1 w makrofagach utrzymywanych w ko-hodowli z ASCEMS potraktowanych AZA/RES.

Najwartościowszymi osiągnięciami wynikającymi z badań nad użytecznością kombinacji AZA/RES w stymulacji chondrogennego różnicowania ASCEMS są:

- wykazanie wzmaganie chondrogennego różnicowania tych komórek, wyrażające się wzmożoną ekspresją pro-chondrogennych genów: wimentyny, dekoryny i czynnika transkrypcyjnego SOX9;
- przedstawienie dowodu na obniżenie ekspresji proapoptotycznego transkryptu p21

- przedstawienie skorelowanej ekspresji antyapoptotycznego genu BCL-2 ze wzmożoną ekspresją dioksygenaz metylcytozyny 2 i 3 (TET2 i TET3), które utleniają 5-metylcytosynę do 5-hydroksymetylcytosyny, co warunkuje usunięcie z DNA metyl cytozyny, etapu niezbędnego do chondrogenego różnicowania;
- ujawnienie pod wpływem wprowadzenia do podłoża hodowlanego obu preparatów, wzmożenia aktywności SOD, potencjału błon mitochondrialnych (MMP), regulacji w górę genów p62 i LAMP-2 (lisosomal associated membrane protein 2), obniżenie stresu siateczki endoplazmatycznej oraz wzbudzanie autofagii co w sumie poprawia tworzenie chrząstkowego podścieliska zewnątrzkomórkowego; jak dalej słusznie zauważa Doktorantka w omówieniu osiągniętych wyników naruszenie autofagii jest ważnym mechanizmem nasilającym apoptozę i starzenie w ASCEMS prowadzące w efekcie do obniżenia potencjału różnicowania.
- zobrazowanie rosnących rozgałęzi sieci mitochondrialnej, odzwierciedlających narastającą fuzję mitochondriów oraz zwielokrotnienie ich liczby;
- potwierdzenie za innymi autorami akumulowania się ROS w mitochondriach, jako przejaw wczesnego różnicowania chondrogenego.

Łącznie, osiągnięte wiarygodne wyniki mają nie tylko wartość poznawczą, ale nabierają znaczenia praktycznego. Zastosowano stosunkowo łatwo dostępne substancje AZA/RES indukujące rejuwenalizację ASC chorobowo zmienionych w wyniku EMS, które mogą przyczynić się do wprowadzenia terapii komórkowej w zakresie zmian stawowych.

Czwarta praca eksperymentalna Doktorantki zwieńczeniem wysiłku badawczego poniesionego w poprzednich pracach. Dotyczy mianowicie immunomodulacyjnych właściwości końskich ASCs, pochodzących osobników dotkniętych EMS. Jak słusznie podaje Doktorantka we wstępie tej pracy w przebiegu EMS ujawniają się zmiany cytofizjologiczne w ASCs, zmniejszające nie tylko ich potencjał regeneracyjny, ale również działanie immunomodulujące na otaczające komórki układu białej krwi. Również i ta skromniejsza pod względem przedstawionej dokumentacji praca wykorzystuje nowoczesne techniki: cystometrii przepływowej: do oceny antygenowej głównie komórek T_{Reg} ekspresjonujących antygeny $CD4^+CD25^+$ FOXP3, RT-PCR do profilowania ekspresji genowej peryferycznych komórek mononuklearnych (PBMCs) pozostających w ko-hodowli z ASCEMS i ASCEMS AZA/RES, RT-PCR, posłużyła także do wyznaczenia ekspresji genów mitofagii: PINK-1, PARKIN, MFN i FIS., testy ELISA do oznaczeń cytokin, reakcję Griessa do oznaczeń NO, oznaczeń LC-3 (mikrotubule-associated protein 1A/1B-light chain), bekliny-1 i LAMP2 do oceny autofagii.

Do najważniejszych osiągnięć tej pracy można zaliczyć:

- wykazanie wzbudzania i zwiększania aktywności komórek T_{Reg} zarówno przez ASCEMS, jak i ASCEMS poddane działaniu AZA/RES. Jest to o tyle doniosłe, że komórki T_{Reg} odgrywające rolę przeciwwzapalną i osłaniającą przed uszkodzeniami tkanek ulegają, jak wykazała Doktorantka, obniżeniu we krwi chorych metabolicznie koni. Postuluje więc możliwość podawania ASCEMS potraktowanych AZA/RES w celu podwyższenia liczby komórek T_{Reg}
- uchwycenie zwiększenia komórek T_{Reg} u koni dotkniętych EMS, ze słusznym stwierdzeniem, że zwiększenie ekspresji cząsteczek MHCII na adipocytach aktywuje komórki $CD4^+$, żeby zapoczątkować zapalenie w tkance tłuszczowej ;
- zwrócenie uwagi na podwyższanie ekspresji mRNA IL-10 i $TGF\beta$ w PBMC po ko-hodowli z ASCEMS potraktowanych AZA/RES. Taka cytokinowa odpowiedź ma korzystne następstwa, gdyż IL-10 hamuje różnicowanie komórek Th17 wykazujących silne działanie prozapalne ujawniające się w cukrzycy 2 typu natomiast $TGF\beta$ aktywuje komórki T_{Reg} ;
- ujawnienie nasilonej autofagii w PBMCs po ko-hodowli z ASCEMS ASA/RES . Doktorantka śmiało stawia tezę, że rejuwenalizacja ASCEMS ze wspomnianymi czynnikami będzie oddziaływać na fizjologiczne własności PBMCs po ich klinicznej aplikacji u koni dotkniętych EMS;
- przedstawienie molekularnego dowodu (wzrost ekspresji mRNA takich cząsteczek kontrolujących mitofagię, jak PINK1, PARKIN, LC3, LAMP-2 i mitofuzyny 2 oraz mitochondrialnego białka rozszczepiającego) na nasilenie mitofagii w PBMCs pod wpływem ASCEMS potraktowanych ASA/RES, co eliminuje

niefunkcjonalne mitochondria i jak przekonuje Doktorantka, nie dochodzi wówczas do mitochondrialnego stresu oksydacyjnego wzbudzanego hiperglikemią;

- naświetlenie supresyjnego działania ASCEMS potraktowanych AZA/RES na zapalne makrofagi, które w efekcie zmniejszają uwalnianie takich mediatorów zapalenia jak TNF α , NO i IL-6.

W pracy tej Autorka wykazała więc przeciwzapalne działanie ASCEMS potraktowanych AZA/RES i homeostatyczne działanie przez pobudzenie aktywności komórek T_{Reg}.

Uwagi: szkoda, że do immunomodulacyjnego wpływu ASCEMS użyto peryferycznych krwinek mononuklearnych i Mf RAW264.7, a nie izolowanych z tkanki tłuszczowej. Wiadomo bowiem, że to nie tylko rodzaj krwinek, ale ich lokalna nisza decyduje o wzorze ekspresjonowanych antygenów i ewentualnym działaniu fizjologicznym lub patologicznym.

Przybliżona całość dorobku badawczego Doktorantki przekonuje o umiejętności postawienia innowacyjnego tematu badawczego, konsekwentnego jego zgłębiania przy użyciu właściwych nowoczesnych metod analitycznych oraz gruntownego zinterpretowania wyników w sposób nie tylko wyjaśniający postawione założenie, ale rodzący perspektywiczne aplikacje. Należy podkreślić opublikowanie załączonego cyklu pięciu prac, składającego się na dysertację doktorską w przeciągu krótkiego dwuletniego przedziału czasowego. Podkreślam również, iż przedstawiona lista uwag, nie umniejsza niekwestionowanej wartości przygotowanej dysertacji, odzwierciedla natomiast troskę o dalszy pozytywny rozwój badawczy Doktorantki.

W końcowej ocenie pragnę zauważyć, że Doktorantka wraz z gronem współpracowników opublikowała szereg innych prac tematycznie powiązanych z oceną ASC, świadczących o dużej dynamice badawczej i publikacyjnej. Na pewno wielką pomocą służył jej opiekun Pan dr hab. Krzysztof Marycz prof. nadzw., który ma okazały dorobek i jest niekwestionowanym autorytetem w obszarze badań użyteczności komórek macierzystych w klinice.

Zapoznanie się z niniejszą pracą doktorską umożliwiło, oprócz przedstawienia podanych zalet i uwag, wysnuć refleksję o dużych umiejętnościach organizatorskich, analitycznych i interpretacyjnych Autorki, a także o konsekwencji w opracowaniu tych wielowątkowych badań. Osiągnięte przez Doktorantkę wyniki przede wszystkim poszerzają dotychczasową wiedzę nt. cech i aplikacyjności ASCEMS i nieuchronnie zmiernają, choć Doktorantka to tylko sygnalizuje, do ich wykorzystania w praktyce leczniczej, tym śmieiej, że tzw. terapia komórkowa, o czym wspomniano we wstępie nabiera zbawiennego znaczenia.

W sumie zastosowane nowoczesne i miarodajne metody przybliżają obraz ultrastrukturalny i wzory ekspresji z jednej strony adipocytarnych komórek macierzystych koni dotkniętych syndromem metabolicznym, z drugiej ich rejuwenację i możliwość odmiennego różnicowania po zastosowaniu AZA/RES. Osiągnięte wyniki wzbogacają wiedzę o dane molekularne nt. adipocytarnych komórek macierzystych koni, są również przydatne dla praktyki leczniczej.

Biorąc pod uwagę w pełni zrealizowany program badań, wiarygodnie przedstawione wyniki, ich szeroką konfrontację z wynikami autorów zagranicznych oraz wskazaniem do ich praktycznego wykorzystania, jestem przekonany, że przygotowana rozprawa doktorska odpowiada warunkom określonym w art. 13 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki.

Przedstawiam więc Radzie Dyscypliny Nauki biologiczne Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu wniosek o dopuszczenie mgr Katarzyny Kornickiej-Grabowskiej do dalszych procedur związanych z uzyskaniem stopnia dr nauk biologicznych w dziedzinie nauki ścisłe i przyrodnicze, dyscyplina Nauki biologiczne.

Z uwagi na znaczny nakład pracy związanej z izolacją, hodowlą i oceną molekularną ASC u koni, miarodajnymi metodami analitycznymi, przejrzystością szerokiej gamy ilustracji dołączonej do każdej publikacji przedkładam Radzie Dyscypliny Nauki biologiczne Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu wniosek o wyróżnienie pracy stosowną nagrodą."

Przewoźnik