



UNIwersytet JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

WYDZIAŁ BIOCHEMII, BIOFIZYKI I BIOTECHNOLOGII

Dr hab. n. med. Ewa Zuba-Surma, Prof. UJ
Zakład Biologii Komórki
Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii
Uniwersytet Jagielloński
ul. Gronostajowa 7
30-387 Kraków
e-mail: ewa.zuba-surma@uj.edu.pl

Kraków, 14 października 2019r.

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”**

wykonanej pod kierunkiem dr hab. Krzysztofa Marycza, prof. nadzw. UP we Wrocławiu
w Katedrze Biologii Eksperymentalnej Wydziału Biologii i Hodowli Zwierząt
Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu.

Komórki macierzyste mezenchymalne/ stromalne (z ang. *mesenchymal stem. stromal cells*; MSCs) od lat stanowią przedmiot wielu badań ukierunkowanych na kliniczne zastosowania tych komórek w naprawie uszkodzeń tkankowych. Ze względu na swoje unikatowe cechy biologiczne, w tym multipotencjalne zdolności do różnicowania w inne dojrzałe komórki oraz aktywność wydzielniczą i produkcję szeregu czynników o działaniu parakrynnym sprzyjających naprawie tkankowej, komórki MSCs stanowią dziś najszerzej stosowaną frakcję komórek macierzystych (KM) w badaniach klinicznych prowadzonych na całym świecie z udziałem pacjentów oraz stanowią przedmiot zainteresowania nauk weterynaryjnych, w tym odnośnie ich auto- i allogenicznego zastosowania w leczeniu uszkodzeń tkankowych u zwierząt.

Ograniczeniem w stosowaniu tych komórek, w szczególności w układach autologicznych, może być częściowa utrata ich funkcjonalności związana z wiekiem lub chorobami, na które cierpi dawca, a które mogą wpływać na właściwości biologiczne KM rezydujących w tkankach. Do takich chorób należą m.in. choroby metaboliczne, a w szczególności cukrzyca typu 2 u ludzi, której negatywnych wpływ na właściwości biologiczne KM, w tym potencjał regeneracyjny, był już

wielokrotnie opisywany przez badaczy. W związku z powyższym, nowe strategie farmakologiczne polegające na zwiększaniu lub przywracaniu potencjału biologicznego KM, w tym komórek MSCs, poprzez ich farmakologiczne „odmładzanie” (z ang. *rejuvenation*) stanowią dziś istotne wyzwanie oraz potrzebę medycyny regeneracyjnej.

Przedstawiona mi do oceny praca doktorska Pani mgr Katarzyny Kornickiej-Garbowskiej wychodzi naprzeciw tym wyzwaniom koncentrując się na optymalizacji strategii przywracania potencjału biologicznego, w tym m.in. właściwości różnicowania oraz poprawy metabolizmu komórek MSCs pozyskiwanych z tkanki tłuszczowej zwierząt (koni) cierpiących na syndrom metaboliczny koni (z ang. EMS – *equine metabolic syndrome*) poprzez farmakologiczne ich „odmładzanie” z zastosowaniem dwóch związków: 5-azacytydyny (AZA) oraz resweratrolu (RES), mających wpływ m.in. na status metaboliczny komórki oraz metylację DNA. Praca porusza ważne i nowe obszary dotyczące endogennych procesów zachodzących w komórkach m.in. wraz z wiekiem oraz w czasie przebiegu chorób metabolicznych, których regulacja i zahamowanie może prowadzić do zachowania właściwego potencjału biologicznego komórek, w tym KM.

W skład przedstawionej mi do recenzji rozprawy wchodzi pięć (5) spójnych tematycznie artykułów naukowych, w tym cztery (4) prace oryginalne oraz jeden (1) artykuł przeglądowy, opublikowane w międzynarodowych czasopismach naukowych o wysokich współczynnikach oddziaływania, w tym m.in. w *J Cell Mol Med* (IF=4.658), *Oxid Med Cell Longev* (IF=4.868), *J Clin Med* (IF=5.688), *Stem Cell Rev Rep* (IF=4.697), co świadczy o wysokim poziomie przeprowadzonych badań, ocenionych również przez niezależnych recenzentów.

W dwóch (2) z czterech prac oryginalnych, gdzie Doktorantka prezentuje m.in. wyniki swoich badań, Pani mgr Katarzyna Kornicka-Garbowska jest pierwszą autorką (w tym w jednym jest także autorem korespondującym), w jednym artykule (1) jest autorem ostatnim i korespondującym oraz w jednym (1) pozostaje drugim autorem, ale z wiodącym (procentowo) wkładem w powstanie tej publikacji (45% udziału). Doktorantka jest także pierwszym i korespondującym autorem w pracy przeglądowej zamykającej cykl 5-ciu w/w artykułów, który podsumowuje również wiedzę w obszarze badawczym, którym w swojej pracy zajmowała się Doktorantka i gdzie na tle wyników innych zespołów światowych prezentuje ona także swoje osiągnięcia badawcze uzyskane w zespole Pana prof. Krzysztofa Marycza, który od kilku lat zajmuje się tematyką zastosowań komórek MSCs w medycynie regeneracyjnej w weterynarii.

Wkład Doktorantki w przedstawione do oceny prac nie budzi zatem wątpliwości i został przy każdej z publikacji wykazany stosownym udziałem procentowym potwierdzonym także przez pozostałych

współautorów wspomnianych artykułów naukowych. Z pewnością wkład Doktorantki w powstanie wyników badań opublikowanych w przedstawionych pracach był kluczowy i wiodący.

Ocena formalna pracy:

Rozprawę rozpoczyna spis treści i oraz szczegółowy, informatywny spis skrótów oraz Streszczenia w języku polskim oraz angielskim, w których Doktorantka w sposób zwięzły i informatywny przedstawia zasadnicze cele i osiągnięcia swojej pracy doktorskiej.

Po nich następuje 12-o stronicowy Wstęp w języku polskim, w którym Doktorantka wprowadza czytelnika w tematykę, której dotyczą jej prace naukowe, w tym w obszar medycyny regeneracyjnej i zastosowań komórek macierzystych (KM) MSCs w medycynie i weterynarii, jak również przedstawia problemy związane z syndromem metabolicznym u koni (EMS), który może także prowadzić do dysfunkcji KM mezenchymalnych (MSCs) u tych zwierząt, uniemożliwiając autologiczne aplikacje. Doktorantka zwięźle uzasadnia także konieczność opracowywania farmakologicznych podejść w odnowie funkcjonalnej takich komórek, wskazując konkretne procesy komórkowe, które mogą stanowić cele takich działań. Koncepcję prowadzonych przez siebie badań Doktorantka dobrze uzasadnia na tle badań światowych oraz bieżących potrzeb medycyny regeneracyjnej. Wstęp jest zaopatrzony w informatywną Rycinę podsumowującą niekorzystne procesy zachodzące w komórkach MSCs w tkankach zwierząt obarczonych EMS, na których Doktorantka koncentrowała się w swoich badaniach naukowych modulując ich przebieg z zastosowaniem AZA i RES.

W kolejnej części rozprawy poprzedzającej przedstawione do oceny artykuły naukowe, Doktorantka przedstawiła krótko główny Cel pracy obejmujący ocenę wpływu AZA i RES na wybrane funkcje MSCs, w tym ich fenotyp, potencjał różnicowania i właściwości proregeneracyjne (w przebiegu EMS) oraz ich właściwości immunomodulacyjne, a także przedstawiła cele szczegółowe, które odpowiadają badaniom opublikowanym w artykułach naukowych przedstawionych w dalszej części pracy.

Cykl 5-u artykułów naukowych zamyka Dyskusja (16 stron) w języku polskim, która wyczerpująco omawia uzyskane w pracach wyniki oraz przedstawia ich znaczenie na tle literatury światowej. Doktorantka odnosi się w swojej rozprawie – w szczególności w części swojego Wstępu oraz Dyskusji - do ponad 200 (dokładnie: 223) pozycji literaturowych.

Rozprawę zamyka rozdział Podsumowanie i Wnioski końcowe, gdzie Doktorantka krótko podsumowuje najważniejsze osiągnięcia i wyniki uzyskane w przedstawionej pracy doktorskiej oraz podkreśla ich znaczenie.

Wymienione części pracy w języku polskim zostały napisane poprawnym językiem, a w tekście można znaleźć jedynie nieliczne błędy interpunkcyjne nie mające wpływu na ocenę pracy.

Od strony formalnej rozprawa jest bardzo stranna i w pełni spełnia wymogi stawiane tego typu pracy i stanowi spójne dzieło opsujące uzyskane przez Doktorantkę wyniki badań naukowych oraz ich znaczenie i wkład w naukę.

Ocena merytoryczna:

Ze względu na to, że zasadniczą część recenzowanej rozprawy stanowią opublikowane już artykuły naukowe, które zostały poddane szczegółowej recenzji przez międzynarodowych ekspertów opiniujących artykuły naukowe przed ich opublikowaniem w światowej literaturze naukowej (w zakresie m.in. jakości, interpretacji i znaczenia prezentowanych wyników badań oraz stoswanej metodyki), moja ocena jako recenzenta ma charakter wtórny.

Niemniej jednak ze swojej strony, po szczegółowym zapoznaniu się z przedstawionymi publikacjami Doktorantki, zaprezentowane wyniki badań oceniam bardzo wysoko.

Doktorantka w swojej pracy badawczej wykorzystwała wymagający materiał badawczy, który stanowiły pierwotne komórki MSCs izolowane od zwierząt (koni; w tym z syndromem EMS), a także zastosowała szereg nowoczesnych i poprawnie dobranych metod z zakresu biologii komórkowej i molekularnej, które wymagały szeregu optymalizacji metodycznych, a w mojej ocenie pozwoliły na uzyskanie ważnych, wiarygodnych wyników, które Doktorantka właściwie zinterpretowała i przedyskutowała na tle literatury światowej.

W swoich badaniach przedstawionych do oceny w niniejszej rozprawie, Doktorantka uzyskała szereg ważnych wyników mających istotne znaczenie dla badań biologii i zastosowań KM w regeneracji tkanek u ludzi i zwierząt, w tym w szczególności w zakresie poprawy ich funkcji biologicznych z zastosowaniem terapii farmakologicznej *ex vivo*. Doktorantka wykazała m.in., że związki takie jak AZA oraz RES, działające na odpowiednio na strukturę chromatyny komórek poprzez wpływ na status jej metylacji oraz na regulację m.in. ścieżki sygnałowej mTOR kluczowej m.in. w regulacji procesów autofagii, senescencji i apoptozy komórkowej, mogą wpływać na zahamowanie szeroko pojętych procesów starzenia się i postępującej dysfunkcji metabolicznej komórek, w tym komórek MSCs, co stanowi istotne odkrycie w kontekście aplikacji KM w regeneracji tkanek.

Doktorantka w swoich badaniach wykazała m.in. że:

- 1) Komórki MSCs izolowane z tkanki tłuszczowej (TK) koni z EMS wykazują upośledzone funkcje biologiczne, w tym potencjał do różnicowania (kluczowy z punktu widzenia regeneracji) w porównaniu z komórkami od zwierząt zdrowych;

2) Farmakoterapia *ex vivo* z zastosowaniem dobranych odpowiednio dawek AZA i RES: i) odwraca procesy senescencji w komórkach MSCs izolowanych z tkanek zwierząt z EMS - poprzez m.in. obniżenie stresu oksydacyjnego, aktywację autofagii i mitofagii, a także demetylację DNA w tych komórkach, a także ii) zwiększa ich potencjał osteogeny i chondrogeny oraz iii) poprawia ich właściwości immunomodulacyjne (w tym w kierunku aktywacji regulatorowych limfocytów Treg), co razem może zwiększać potencjał regeneracyjnych tych komórek *in vivo*.

Odkrycia Doktorantki mają w mojej ocenie nie tylko znaczenie dla medycyny weterynaryjnej, gdzie z pewnością znajdują swoje zastosowania praktyczne w poprawie leczenia np. powikłań związanych z EMS u koni (z zastosowaniem autoprzeszczepów komórek MSCs farmakologicznie prekondukcjonowanych *ex vivo*), co jest zasadniczym celem badań całego zespołu, w którym pracuje Doktorantka, ale także mają istotne znaczenie dla medycyny regeneracyjnej u ludzi – ze względu na opracowanie nowej strategii poprawiającej funkcje biologiczne KM „upośledzonych” funkcjonalnie wraz z wiekiem, bądź w związku z towarzyszącą chorobą metaboliczną (np. cukrzycą typu 2).

Biorąc pod uwagę fakt starzejących się społeczeństw oraz powszechność choroby cywilizacyjnej jaką jest cukrzyca typu 2 u ludzi, nowe strategie farmakologicznego „odmładzania” KM mają dziś istotne znaczenie, ponieważ przywracają możliwość autologicznych zastosowań komórek u tych pacjentów w różnych sytuacjach klinicznych, w tym w regeneracji uszkodzonych tkanek, co ma istotne znaczenie poznawcze i praktyczne.

Uzyskane wyniki badań opublikowane przez Doktorantkę i zespół, w którym pracuje uważam zatem za bardzo istotne i aplikacyjne.

W czasie lektury rozprawy nasunęło mi się kilka pytań merytorycznych oraz wątpliwości metodycznych, na które chciałabym poprosić Doktorantkę o odpowiedź i wyjaśnienia w czasie jej prezentacji i obrony uzyskanych wyników:

1. Jak długo utrzymywał się efekt „odmłodzenia” funkcjonalnego w komórkach MSCs od zwierząt z EMS po traktowaniu AZA/ RMS? Czy po 24-godzinnym traktowaniu i odstawieniu tych związków komórki można poddać dłuższej ekspansji w hodowli *in vitro* z zachowaniem ich zmienionych (zwiększonych) właściwości biologicznych (np. przez kilka pasażów), czy też traktowanie AZA/ RMS należy powtarzać?

2. Na str. 22 Wstępu Doktorantka rysuje ciekawą alternatywę leczenia chorób metabolicznych (w tym np. EMS u koni i cukrzycy typu I, II i IR u ludzi) z zastosowaniem komórek MSCs (np. z tkanki tłuszczowej). Czy Doktorantka mogłaby rozwinąć tę koncepcję koncentrując się dokładniej na potencjalnych mechanizmach działania MSCs u takich pacjentów, skutkujących zmianami w przebiegu samej choroby metabolicznej? Czy Doktorantka ma na myśli zastosowania autologiczne, czy raczej allogeniczne u takich pacjentów (zwierząt i ludzi)?
3. Innym związkiem testowanym obecnie na świecie w celu farmakologicznego „odmładzania” KM jest także Rapamycyna - wpływająca również na szlaki związane m.in. z senescencją i apoptozą komórek. Jestem ciekawa, czy Doktorantka w swoich badaniach stosowała także (np. na etapie optymalizacji badań lub w innych badaniach poza tą rozprawą) ten właśnie związek? Czy Doktorantka mogłaby przedstawić zalety zastosowania Resweratrolu (RES) względem Rapamycyny i uzasadnić wybór RES w jej pracy badawczej? Czy Doktorantka widzi uzasadnienie merytoryczne ew. zastosowania obu związków w „prekondycjonowaniu” MSCs celem poprawy ich właściwości biologicznych?
4. Czy Doktorantka testowała działanie AZA oraz RES w komórkach MSCs, kiedy te związki były dodawane osobno? Czy obserwowała poprawę funkcji komórek MSCs po podaniu pojedynczego związku, czy takie efekty były widoczne tylko przy terapii łączonej?
5. W jaki sposób Doktorantka dobierała przeciwciała stosowane w barwieniach immunofluorescencyjnych, aby zapewnić specyficzność barwienia komórek pozyskiwanych od koni? Biorąc pod uwagę zasadniczo brak dostępności przeciwciał „anty-końskich” - jakie przeciwciała (pod względem gatunku) Doktorantka testowała przy ocenie ew. reakcji krzyżowej z antygenami komórek końskich? Podobnie, od strony metodycznej jestem ciekawa jaką strategię Doktorantka przyjęła przy projektowaniu starterów do reakcji PCR oceniającej ekspresję genów w komórkach koni.

Powyższe pytania wynikają jedynie z mojej z ciekawości naukowej i eksperymentalnej i nie stanowią w żadnym razie elementu krytycznej oceny pracy. Przeciwnie, myślę, że mogą być przyczynkiem do ciekawej do dyskusji nad znaczeniem uzyskanych wyników oraz szczegółami metodyki stosowanej przez Doktorantkę w jej pracy badawczej, co nie zawsze ma szansę zostać odzwierciedlone w publikacjach ze względu na ich zwięzłość formalną.

Podsumowując, praca doktorska Pani mgr Katarzyny Kornickiej-Garbowskiej wpisuje się w istotny nurt badań biomedycznych z zakresu medycyny regeneracyjnej, koncentrując się na farmakologicznym prekondycjonowaniu komórek macierzystych MSCs izolowanych od dawców obarczonych chorobą metaboliczną – celem poprawy ich funkcji biologicznych przed potencjalnym zastosowaniem w celach regeneracyjnych. Doktorantka podjęła w swojej pracy szereg działań mających na celu nie tylko dobranie odpowiednich związków o takim działaniu na komórki MSCs (tu: AZA i RES), ale także wyjaśnieniu mechanizmów komórkowych oraz molekularnych, które są odpowiedzialne za zmianę funkcjonalną w „odmładzanych” komórkach.

W mojej ocenie, uzyskane przez Doktorantkę wyniki mają istotne znaczenie nie tylko dla nauk weterynaryjnych, ale także innych dziedzin nauk biomedycznych, a także niosą istotny aspekt poznawczy i aplikacyjny.

Stwierdzam, że przedstawiona do recenzji praca spełnia warunki określone w art. 13 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.) i wnoszę o dopuszczenie Pani mgr Katarzyny Kornickiej-Garbowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie, z uwagi na wysoką wartość naukową rozprawy oraz znaczenie aplikacyjne uzyskanych wyników pracy doktorskiej, jak również na dotychczasowy bardzo znaczący dorobek naukowy Pani mgr Katarzyny Kornickiej-Garbowskiej - obejmujący m.in. sumarycznie 29 publikacji naukowych - wnoszę również o jej wyróżnienie stosowną nagrodą.



