

Recenzja

rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Malwiny Mularczyk

w formie zbioru publikacji prezentowanego pod tytułem:

„Astaksantyna i postbiotyki – dwa obiecujące czynniki zwiększające wrażliwość na insulinę w zespole metabolicznym koni”

Zespół metaboliczny u koni (EMS) po raz pierwszy opisano w 2002 roku jako syndrom chorobowy związany z narastającą otyłością brzuszną postępującą z rozwojem niewrażliwości na insulinę (hiperinsulinemią), nietolerancją glukozy, dyslipidemią, nadciśnieniem i postępującym ochwatem. Nieliczne badania wskazywały na zbieżność zespołu EMS u koniowatych z ludzki zespół metaboliczny (MetS). Jednak nadal wiele aspektów dotyczących etiologii, patogenezы oraz mechanizmów łączących EMS z jego wtórnymi konsekwencjami nie zostało w pełni poznane.

Zespół EMS zdefiniowano jako chorobę obejmującą szereg objawów klinicznych prowadzących do rozwoju ochwatu u koni cierpiących na otyłość. Kolejne badania potwierdzały złożony i wieloczynnikowy charakter zespołu EMS, którego objawiamy klinicznymi są otyłość lub miejscowe odkładanie tkanki tłuszczowej, spadek ogólnej oceny kondycji zwierzęcia (BCS); nadciśnienie tętnicze i skłonność do ochwatu. U koni dotkniętych chorobą, w konsekwencji zwiększonego gromadzenie się tkanki tłuszczowej następuje powiększenia rozmiaru adipocytów, które z kolei znajdują się pod wpływem stresu oksydacyjnego wynikającego z dysfunkcji śródbłonna i słabej dyfuzji tlenu. Tkanka tłuszczowa syntetyzuje i wydziela podwyższone ilości aktywnych biologicznie adipokin, które deregulują m.in. przemiany metaboliczne, funkcje układu sercowo-naczyniowego oraz odpowiedź immunologiczną organizmu. U osobników chorych obserwuje się insulinooporność, zaburzenia gospodarki lipidowej (hiperlipidemię), hiperleptynemię i hiperinsulinemię. Poza nawracającym ochwatem, jako pierwszym najczęściej diagnozowanym objawem EMS,

K. Ropka-Molik

dotknięte tym zespołem konie, znajdują się w grupie podwyższonego ryzyka kolki. Występują też u nich lokalne i ogólnoustrojowe stany zapalne czy też zaburzenia rozrodu.

Wystąpienie EMS determinują czynniki środowiskowe takiej jak żywienie i wysiłek fizyczny oraz prawdopodobnie podłoże genetyczne. Wysokoprzepustowe badania molekularne wskazują na fakt, że niektóre rasy koni i kucyków mogą być genetycznie predysponowane do wystąpienia zespołu metabolicznego. Ponadto, w świetle najnowszych badań diagnozowanie wystąpienia EMS wyłącznie na podstawie otyłości okazało się być mylące. Bardzo istotne wydaje się być odpowiednia diagnostyka, a następnie odpowiednie leczenie uwzględniające farmakologię, ćwiczenia oraz podejście żywieniowe jako narzędzie leczenia oraz prewencji.

Ze względu na fakt, że EMS jest zespołem chorobowym ściśle związanym z zaburzeniami przemiany materii właściwe żywienie odgrywa kluczową rolę w leczeniu i zapobieganiu nawrotom choroby. Nieprawidłowe odkładanie się tkanki tłuszczowej i insulinooporność sprawia, że zbilansowana dieta jest niezbędna do utrzymania koni z zespołem EMS w dobrej kondycji. Nieliczne badania wskazują na pozytywny wpływ określonych substancji takich jak przeciwutleniacze oraz stymulatory mikroflory jelitowej na profilaktykę syndromu metabolicznego. Rozprawa doktorska Pani mgr inż. Malwiny Mularczyk wpisuje się właśnie w ten obszar badań. Doktorantka postawiła sobie za cel ocenę na poziomie molekularnym wpływu wybranych substancji bioaktywnych (astaksantyny oraz emulsji pro- i postbiotyków) na insulinooporność komórek progenitorowych tkanki tłuszczowej pochodzącej od koni z zespołem EMS oraz komórek HEpG2 z indukowaną insulinoopornością. Szereg wykonanych analiz potwierdził korzystny wpływ badanych substancji na traktowane linie komórkowe podnosząc ich wrażliwość na insulinę, obniżając stres oksydacyjny i intensywność procesów apoptotycznych. Uważam, że uzyskane wyniki stanowią cenne źródło wiedzy zarówno w zakresie poznawczym dla procesów podstawowych determinujących występowanie syndromu metabolicznego jak i mają duży potencjał aplikacyjny - mogą zostać w przyszłości wykorzystane w żywieniu koni i medycynie weterynaryjnej.

Rozprawa doktorska Pani mgr. inż. Malwiny Mularczyk przygotowana została w języku polskim w formie zbioru publikacji, na który składają się dwie prace oryginalne oraz dwie publikacje przeglądowe o łącznej punktacji MEIN 520 pkt. oraz sumarycznym współczynniku wpływu Impact Factor wynoszącym 22,407 (Marine Drugs; Biomolecules; Biomedicine & Pharmacotherapy). Cykl publikacji stanowi spójną całość, w której udział Doktorantki można oceniać jako wiodący - Doktorantka jest pierwszym autorem w 3 publikacjach, w tym w 2 korespondencyjnym. Autorka jasno i precyzyjnie przedstawiła swój udział w każdej z publikacji, który polegał między innymi na przygotowaniu koncepcji pracy, opracowaniu

poszczególnych metodologii i wykonaniu analiz molekularnych, analizie wyników, przygotowaniu wstępnej wersji manuskryptów lub ich fragmentów oraz uwzględnieniu uwag recenzentów i redakcji. Z formalnego punktu widzenia przedstawiona do oceny dysertacja nie budzi zastrzeżeń. Została ona przygotowana starannie, z zachowaniem właściwych proporcji, a poszczególne rozdziały opisano w sposób przejrzysty i spójny.

Ocena merytoryczna pracy

Oryginalność tematyki i cel badań

Zespół EMS obserwowany jest u koni i kuców wszystkich ras, jednak wybrane rasy charakteryzują się większą predyspozycją do jego wystąpienia. Charakterystyczna dla koni chorych otyłość, insulinooporność, stany zapalne w organizmie a w szczególności nawracające zapalenie tworzywa kopytowego czyli ochwat sprawiają, że zespół EMS jest dużym problemem hodowlanym i wyzwaniem dla medycyny weterynaryjnej. Jednym z największych problemów stanowiących podłoże EMS wydaje się być zmniejszona zdolność do metabolizowania glukozy czyli insulinooporność komórek. Na tle najnowszych doniesień, modyfikacja żywieniowa podnosząca wrażliwość organizmu na insulinę okazuje się być obiecującą strategią terapeutyczną w profilaktyce i leczeniu zespołu EMS. Często bardziej skuteczną niż podejście farmakologiczne. Badania wykonane w ramach przedstawionej do oceny rozprawy doktorskiej wpisują się właśnie w ten obszar tematyczny. Doktorantka postawiła sobie za cel weryfikację hipotezy czy takie substancje bioaktywnie czynnie jak astaksantyna oraz pro- i postbiotyki mogą wywierać korzystny wpływ na komórki z indukowaną insulinoopornością oraz pochodzące od koni z zespołem metabolicznym. W mojej opinii, podjęte przez Doktorantkę badania mają charakter nowatorski wpisując się w najnowsze trendy zarówno tematycznie jak i pod względem doboru metodologii i warsztatu badawczego, a uzyskane wyniki stanowią cenne uzupełnienie już istniejącej wiedzy w tym zakresie. Ze względu na nadal limitowane dane dotyczące patofizjologii zespołu EMS podjęty temat oceniam jak bardzo aktualny a wyniki jako wartościowy wstęp do dalszych badań i podstawę prac aplikacyjnych. Na uwagę zasługuje również fakt, że prace finansowano ze środków zewnętrznych (m. in. trzy projekty NCN SONATINA BIS; OPUS 15; OPUS 18), co dodatkowo potwierdza aktualność i zasadność prowadzonych badań.

Na podstawie wcześniej otrzymanych wyników oraz przeglądu literatury Doktorantka postawiła jasne cele i hipotezę badawczą oraz wyznaczyła na tej podstawie zadania badawcze. Wybór obranego kierunku badań został szczegółowo opisany i umotywowany przez Autorkę

w rozdziale Wstęp. Rozdział ten w przejrzysty i syntetyczny sposób przedstawia złożoną problematykę etiologii zespołu EMS u koni, możliwości leczenia i zapobiegania. Istotną część wstępu stanowi opis substancji bioaktywnych, mikrobiomu jelitowego i ich wpływu na modyfikację zaburzeń metabolicznych. Opis opatrzone 5 rycinami, które dodatkowo przybliżają problematykę badawczą. Interpretacja konieczności prowadzonych badań jest zasadna i mocno podparta danymi literaturowymi.

Metodyka badań

Materia wykorzystany do badań oraz zastosowane metody opisano w dwóch publikacjach naukowych dedykowanych kolejno analizie wpływu astaksantyny na komórki progenitorowe tkanki tłuszczowej (ASC) koni z zespołem EMS oraz emulsji pro- i postbiotyków na komórki wątroby z indukowaną insulinoopornością. Należy podkreślić, że Doktorantka wybrała do analiz dwie tkanki – obie kluczowe dla etiologii rozwoju syndromu metabolicznego. Ponadto, Doktorantka samodzielnie opracowała optymalizację pozyskiwania i ocenę jakości substancji bioaktywnych wykorzystywanych jako czynniki eksperymentalne o korzystnym wpływie na badane linie komórkowe.

W przypadku analizy linii komórkowych tkanki tłuszczowej Autorka zastosowała różne stężenia astaksantyny oraz różne czasy inkubacji, po których wykonano szereg analiz dotyczących oszacowania – stopnia żywotności proliferacji komórek; syntezy DNA; stopnia akumulacji reaktywnych form tlenu (ROS); potencjału tworzenia kolonii; morfologii mitochondriów i zmian w potencjale błony mitochondrialnej; analiza ekspresji genów oraz poziomu ekspresji wybranych białek. W mojej opinii prawidłowo dobrano grupy kontrolne jako komórki pochodzące od zdrowych koni, od koni z zespołem metabolicznym oraz te ostatnie traktowane równymi stężeniami astaksantyny.

Dobór metod w stosunku do założonych celów oceniam jako prawidłowy i umożliwiający kompleksowe podejście do tematu. W przypadku tej części rozprawy prosiłabym o wyjaśnienie od ilu zwierząt (zdrowych i z zespołem EMS) pobrano wyjściowo tkankę tłuszczową wykorzystaną do uzyskania linii komórek ASC. Czy było to kilka koni, czy pojedyncze osobniki w grupie, czy w jakiś sposób metodyczny uwzględniono zmienność osobniczą? Proszę jeszcze o doprecyzowanie w jakim celu izolowano RNA z mitochondriów – podrozdział 2.11 i częściowo 2.12? Do analizy ekspresji, których genów wykorzystano tą procedurę, ponieważ wszystkie geny wymienione w Tabeli 1 zlokalizowane są na chromosomach genomowego DNA. Bardzo podobny panel genów analizowano w ramach

drugiej pracy oryginalnej i tam analizowano już wyłącznie tzw. total RNA. Proszę jeszcze o krótki komentarz dla obu prac oryginalnych czy przy projektowaniu amplikonów uwzględniono obecność wariantów splicingowych? Czy i jaką metodą analizowano jakość uzyskanego RNA.

Drugi eksperyment dotyczył wpływu emulsji probiotycznych na status komórek wątroby HepG2 z indukowaną insulinoopornością. Autorka wykonała szereg analiz takich jak badanie akumulacji wolnych kwasów tłuszczowych; aktywności kaspaz oraz intensywności procesów apoptotycznych; zmian potencjału błony mitochondrialnej; stresu oksydacyjnego; aktywności enzymów antyoksydacyjnych; analiza poboru glukozy, ekspresji wybranych genów i białek. Wszystkie procedury zostały szczegółowo opisane w publikacji a ich dobór i zastosowanie oceniam jako prawidłowe i zasadne.

Na uwagę zasługuje fakt bardzo dużej liczby wykorzystanych metod badawczych oraz ich praco- i czasochłonność. Pozwoliło to Doktorantce na kompleksowe podejście do tematu, a wielowątkowy charakter badań podkreślił wiarygodność uzyskanych wyników. Intersująca wydaje się być analiza wpływu badanych substancji na obie tkanki np. próba określenia wpływu astaksantyny również na komórki wątroby z indukowaną insulinoopornością. Czy brała Pani to pod uwagę i czy może są w planie takie badania?

Wyniki oraz Dyskusja

W skład rozprawy doktorskiej wchodzi 4 publikacje podzielone tematycznie na dwie prace oryginalne i poprzedzające je prace przeglądowe. Wyniki dla poszczególnych eksperymentów przedstawiono w pracach oryginalnych w sposób czytelny i przejrzysty na licznych rycinach i zdjęciach. Rozdziały podzielono na podrozdziały dedykowane dla poszczególnych metod, co dodatkowo ułatwia zapoznanie się z licznymi wynikami.

Poza poprawną i czytelną prezentacją wyników ich wartość merytoryczną oceniam bardzo wysoko. Doktorantka wykazała, że astaksantyna, przy braku działania cytotoksycznego, pozytywnie wpływała na żywotność oraz proliferację komórek progenitorowych tkanki tłuszczowej koni z zespołem EMS. Z drugiej strony, dodatek astaksantyny obniżał nasilenie procesów apoptotycznych, stres oksydacyjny komórek oraz działał ochronnie na mitochondria, jednocześnie stymulując ich metabolizm. Silny efekt antyoksydacyjny astaksantyny, Doktorantka powiązała z jej wpływem na metabolizm mitochondriów oraz modyfikację szlaków fosforylacji oksydacyjnej OXPHOS. Wszystkie te właściwości zdają się być

K. Rępała-Moś

odpowiedzią na dysfunkcję komórek tkanki tłuszczowej obserwowane u koni cierpiących na EMS.

W przypadku komórek wątroby z indukowaną insulinoopornością traktowanych emulsjami pro- i postbiotycznymi Doktorantka również wskazała na korzystny wpływ tych substancji na metabolizm mitochondriów, łagodzenie stresu oksydacyjnego i obniżenie akumulacji lipidów. Ponadto, uzyskane wyniki wskazują na spadek tempa procesów apoptotycznych indukowanych obecnością wolnych kwasów tłuszczowych. Za jeden z najważniejszych wyników uważam wskazanie przez Doktorantkę wpływu dodatku emulsji probiotycznych na przywrócenie szlaków sygnalizacyjnych dla insuliny, efekt ochronny przy zapobieganiu powstaniu insulinooporności oraz normalizacji i osłabieniu procesów fosforylacji oksydacyjnej w hepatocytach z indukowaną insulinoopornością. Wyniki potwierdzono na poziomie analiz komórkowych, ekspresji genów i białek.

Z uwagi na fakt, że niniejsza dysertacja stanowi cykl publikacji a zawarta w rozprawie dyskusja jest bardzo skrótowa ocenie poddano przegląd literatury oraz dyskusje zawarte w poszczególnych publikacjach. Doktorantka starannie i wyczerpująco dobrała pozycje piśmiennictwa zarówno dla opracowań przeglądowych jak i prac oryginalnych. Przytoczone pozycje literatury wynoszą kolejno 147 i 240 dla opisu astaksantyny oraz emulsji postbiotyków i stanowią one obcojęzyczne i w dużym stopniu najnowsze piśmiennictwo. Obie publikacje przeglądowe precyzyjnie wprowadzają w temat, pogłębiają wiedzę w tym zakresie i podkreślają zasadność wyboru astaksantyny; probiotyków i postbiotyków jako czynników bioaktywnych podnoszących wrażliwość komórek na insulinę.

W pracach oryginalnych, uzyskane rezultaty Doktorantka w sposób trafny i dojrzały przedyskutowała z aktualnymi pozycjami literatury. Autorka wyczerpująco przeanalizowała uzyskane rezultaty i w połączeniu z dostępnymi danymi literaturowymi wskazała na korzystany i precyzyjny efekt badanych substancji na procesy molekularne leżące u podłoża insulinooporności komórek a tym samym etiologii zespołu EMS. Doktorantka jednocześnie wypunktowała procesy i szlaki metaboliczne zaangażowane w patogenezę syndromu EMS a z drugiej strony wskazała substancje biologicznie czynne i sposób ich działania hamujący i/lub prewencyjny dla zjawiska insulinooporności na modelu komórek wątroby oraz tkanki tłuszczowej. Na uwagę zasługuje fakt, że uzyskane w ramach niniejszej rozprawy wyniki posiadają duży potencjał aplikacyjny i wierzę, że w przyszłości znajdą zastosowanie bezpośrednio w praktyce. Poziom naukowy Dyskusji zawartych w publikacjach oceniam bardzo wysoko.

Wnioski

Na podstawie przeprowadzonych badań Autorka synestetycznie podsumowała 7 najważniejszych wyników oraz sformułowała dwa wnioski wskazując na mechanizm działania substancji czynnych na poszczególne typy komórek w aspekcie zmian metabolicznych. Wnioski wyciągnięto poprawnie i zgodnie z postawionymi celami, jednocześnie bardzo ostrożnie. W mojej opinii na podstawie tak licznych wyników można pokusić się o bardziej szczegółowe wnioski uwypuklające poszczególne szlaki czy mechanizmy molekularne działania badanych czynników.

Prosiłabym jeszcze Doktorantkę o przybliżenie możliwego zastosowanie uzyskanych wyników w leczeniu koni z zespołem metabolicznym. Czy widzi Pani takie zastosowanie i w jakiej formie? W jakich ramach czasowych było by ono realne? Czy jest możliwy niekorzystny efekt badanych substancji na inne organy czy tkanki? Czy skład emulsji pro- i postbiotyków jest w pełni odtwarzalny i łatwy do wystandaryzowania?

Wyniki uzyskane w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej stanowią obszerne, ale jednocześnie spójne i kompleksowe opracowanie. Wnioski wyciągnięto poprawnie, zgodnie z uzyskanymi wynikami i stanowią podstawę do dalszych badań w tym zakresie, a w dłuższej perspektywie posiadają duży potencjał aplikacyjny. Oryginalność poruszanej tematyki rozprawy doktorskiej oraz jej poziom naukowy oceniam bardzo wysoko, a wymienione uwagi nie umniejszają wartości przedstawionego osiągnięcia.

Podsumowując recenzję stwierdzam, że przedstawiona do oceny praca doktorska, wpisująca się w obszar dziedziny nauk ścisłych i przyrodniczych, dyscyplinę nauk biologicznych, spełnia wymogi określone w art. 187 ust.1-4 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2023, poz. 742 ze zm.) i wnoszę o dopuszczenie **mgr inż. Maliwny Mularczyk** do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ponadto, ze względu na duży zakres zrealizowanych badań, dokładnie i skrupulatnie przeprowadzoną analizę, oryginalność tematyki i uzyskanych rezultatów wnoszę o wyróżnienie niniejszej rozprawy.

Katarzyna Ropka-Molik

dr hab. Katarzyna Ropka-Molik, prof. IZ