

### RECENZJA

rozprawy doktorskiej Mgr inż. Malwiny Katarzyny Mularczyk

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

przygotowanej pod kierunkiem naukowym prof. dr hab. Krzysztofa Marycza oraz prof. dr Michaela Röckena (drugi promotor)

Recenzję wykonano na podstawie powołania mnie na recenzenta przez Radę Dyscypliny Nauki Biologiczne UP we Wrocławiu uchwałą z dnia 19 września 2023 r.

Zespół metaboliczny koni EMS jest chorobą charakteryzującą się otyłością, insulinoopornością i predyspozycją do ochwatu. Dotyka często grupy zwierząt tj. kuce, mustangi czy osły, utrzymywanych w warunkach naturalnych lub hodowanych w celu przetrwania w trudnych warunkach klimatycznych. Odkładanie tkanki tłuszczowej, w postaci poduszek tłuszczowych, ma miejsce zwykle w okolicy głowy, więzadła karkowego, łopatki i ogona, i ma zapewnić duże rezerwy energii, gdy brakuje pożywienia. Chociaż statystycznie najczęściej chorują rasy prymitywne, tzw. „łatwe w utrzymaniu” opisywane są też przypadki u koni czystej krwi arabskiej, quarter horses, tennessee walking horses, koni pełnej krwi angielskiej i klusaków. Tak więc zespół metaboliczny występuje u koni aktywnych sportowo, które przekarmiane są paszami wysokoenergetycznymi oraz wysokoskrobiowymi. Obecnie uważa się, że choroba ta jest spotykana u wszystkich ras koni.

Jedną z najpoważniejszych konsekwencji EMS jest rozwój nawracającego lub przewlekłego ochwatu, z typową, silną reakcją bólową oraz uszkodzeniami mechanicznymi struktur kopyta. Wymaga to w najlepszym przypadku specjalnego postępowania terapeutycznego i rehabilitacyjnego, co wyklucza konia z użytkowania, w najgorszym przypadku zaburzenia te mogą zagrażać życiu zwierzęcia. U podstaw patomechanizmu *laminitis*, w przebiegu EMS, leżą zaburzenia układu hormonalnego, wpływ działających endokrynnie, a uwalnianych np. z tkanki tłuszczowej mediatorów zapalnych, głównie cytokin oraz destrukcyjne działanie wolnych rodników tlenowych. Mając powyższe na względzie, identyfikacja EMS u koni staje się kluczowa dla lekarzy klinicystów, ponieważ są to pacjenci

o podwyższonym ryzyku wystąpienia ochwatu. Odpowiednie postępowanie z końmi chorującymi na EMS ma na celu przede wszystkim zapobieganie ochwatowi, a także zapewnienie stałej opieki zwierzętom cierpiącym na ochwat przewlekły.

Należy bezwzględnie podkreślić, że leczenie EMS wcale nie należy do łatwych i wymaga nie tylko prawidłowej farmakoterapii ale również utrzymania rygoru żywieniowego, za utrzymanie którego odpowiedzialny jest właściciel, na którym spoczywa np. przygotowywanie posiłków, liczenie kalorii oraz kontrola czasu wypasu na pastwisku. W odniesieniu do farmakoterapii coraz częściej stosowany jest chlorowodorek metforminy stosowany per os jako lek obniżający poziom glukozy we krwi. O ile u ludzi, daje on obiecujące rezultaty w postaci unormowania glikemii, ograniczenia insulinooporności oraz spadku masy ciała, u koni ze względu na ograniczoną biodostępność metforminy po podaniu doustnym takie zmiany nie zawsze są obserwowane. Skomplikowana, czasami niestety nieskuteczna terapia skłania do większego zainteresowania sposobami prewencji syndromu metabolicznego koni bardziej niż jego leczeniem.

Znajomość oraz zrozumienie patomechanizmów leżących u podstaw syndromu metabolicznego koni wraz z jego konsekwencjami i powikłaniami, wciąż nie jest do końca poznane i stanowi obszar aktywnych badań. W zakres takich badań wpisuje się przedstawiona do recenzji praca doktorska mgr inż. Malwiny Mularczyk. Praca zawiera niezbędne, przewidziane dla dysertacji doktorskich części, w tym:

-wykaz skrótów, streszczenie w języku polskim i angielskim, składający się z 7 podrozdziałów wstęp, cel pracy z uwzględnieniem hipotezy badawczej oraz zadania badawczego, cykl publikacji stanowiących rozprawę doktorską, dyskusję, podsumowanie i wnioski końcowe oraz obszerną bibliografię liczącą 102 pozycje piśmiennictwa. Spośród czterech publikacji włączonych do rozprawy doktorskiej, dwie są pracami oryginalnymi, natomiast dwie mają charakter prac przeglądowych. Łączny IF załączonych prac to 22,407. Doktorantka jest pierwszym autorem w trzech z czterech publikacji.

W oparciu o zawarte w załączonych publikacjach informacje, Doktorantka we wstępie zwięźle opisuje patomechanizm EMS, udział stresu oksydacyjnego w tym zaburzeniu oraz przedstawia rolę tkanki tłuszczowej, głównie jako źródła adipokin oraz cytokin prozapalnych. Pochyliła się nad zmianami w proliferacji, oraz zwiększonej apoptozie somatycznych komórek progenitorowych tkanki tłuszczowej. Uwzględnia też nieprawidłowości w budowie i funkcjonowaniu mitochondriów tych komórek, co przekłada się z kolei na nadmierną generację i magazynowanie wewnątrzkomórkowe reaktywnych form tlenu. Ze zrozumiałych względów,

dużo miejsca Doktorantka poświęca zagadnieniom związanym z mikrobiomem jelitowym oraz substancjami bioaktywnymi pozyskiwanym z mikroorganizmów, głównie astaksantynie.

Następnie Doktorantka formułuje główny cel swojej pracy jakim jest ocena wpływu bioaktywnych substancji pochodzenia mikrobiologicznego: ekstraktów astaksantyny z biomasy drożdży *Phaffia rhodozyma* oraz emulsji pro- i postbiotycznych, które wykazują działanie uwrażliwiające na insulinę komórki progenitorowe tkanki tłuszczowej (ASC) izolowane od koni cierpiących na syndrom metaboliczny oraz komórki HepG2 z indukowaną insulinoopornością.

Ponieważ główny cel jest dosyć obszerny Doktorantka precyzuje poszczególne cele, które dotyczą optymalizacji wzrostu drożdży *Phaffia rhodozyma* oraz pozyskiwania i izolacji astaksantyny, optymalizacji wzrostu szczepów probiotycznych i formułacji emulsji micelarnej, ocenę wpływu astaksantyny na funkcje komórkowe i dynamikę mitochondriów, poprzez zmniejszenie stresu oksydacyjnego w ASC (EMS), ocenę wpływu emulsji bogatej w probiotyki na zmniejszenie insulinooporności indukowanej przez akumulację wolnych kwasów tłuszczowych w linii komórkowej HepG2 oraz wyjaśnienie powiązanych szlaków molekularnych, ze szczególnym uwzględnieniem szlaku Fetuin-A.

Umieszczona w pracy hipoteza badawcza, zakłada, że preinkubacja komórek ASC (izolowanych od koni cierpiących na EMS) z astaksantyną, będzie hamować apoptozę, łagodzić stres oksydacyjny oraz usprawniać mitochondrialny system fosforylacji oksydacyjnej (OXPHOS), a tym samym kontrolować i niwelować stres oksydacyjny, co przełoży się na poprawę stanu metabolicznego komórek ASC. Natomiast preinkubacja komórek HepG2 z indukowaną insulinoopornością *in vitro*, wraz z emulsją pro- i postbiotyczną, w warunkach IR, będzie chronić komórki przed apoptozą, łagodzić stres oksydacyjny, a także poprawiać metabolizm i dynamikę mitochondriów oraz zmniejszać aktywację szlaku Fetuin-A/TLR4/JNK/NF- $\kappa$ B. Doktorantka, zakłada, że zastosowana emulsja pro- i postbiotyczna będzie wykazywała działanie ochronne przed zapaleniem, otyłością oraz insulinoopornością związaną z funkcją wątroby.

Ponieważ przedstawiona do recenzji praca doktorska opiera się na już pozytywnie ocenionych i opublikowanych wynikach, nie ma potrzeby w moim mniemaniu opisywać ich szczegółowo w tej recenzji. Niemniej jednak pragnę podkreślić, że uzyskane przez Doktorantkę wyniki zostały przedstawione w sposób bardzo szczegółowy, przejrzysty z prawidłowym doбором analiz statystycznych. Mało tego, muszę podkreślić, że aby uzyskać takie wyniki Doktorantka zastosowała nowoczesne i różnorodne metody badawczo-analityczne takie chociażby jak: Real-Time PCR, Western Blot, cytometria przepływowa czy metody

immunoenzymatyczne. W swoich badaniach wykazała się też znajomością pracy z hodowlami komórkowymi i oceną komórek pod kątem ich żywotności, proliferacji i programowanej śmierci.

Chociaż jak wspomniałam wcześniej, trudno jest się odnieść do już opublikowanych wyników, chcę podkreślić ze odzwierciedleniem tego jak trafne było podjęcie przez Doktorantkę takich a nie innych badań w zakresie EMS, jest fakt potwierdzenia słuszności przyjętych w pracy tez badawczych. I tak wyniki uzyskane w ramach prowadzonych badań potwierdziły założenia pierwszej hipotezy badawczej, zakładającej, że preinkubacja komórek ASC izolowanych od koni cierpiących na EMS z astaksantyną będzie hamować apoptozę, łagodzić stres oksydacyjny oraz usprawniać mitochondrialny system fosforylacji oksydacyjnej (OXPHOS), a tym samym kontrolować i niwelować stres oksydacyjny, poprawiając stan metaboliczny ASC. Ekspozowanie komórek ASC izolowanych od koni z syndromem metabolicznym na astaksantynę w dawce 10 i 20 µg/ml znacząco zmniejszyło apoptozę poprzez modyfikację znormalizowanej aktywności kaspazy szlaków proapoptotycznych (p21, p53 i Bax). Ponadto, regulując ekspresję powiązanych głównych czynników SOD1, SOD2, PARKIN, PINK 1 i MFN 1, astaksantyna łagodziła stres oksydacyjny i zaburzenia dynamiki mitochondriów.

Kolejna potwierdzona w badaniach Doktorantki hipoteza, dotyczyła protekcyjnego wobec insulinooporności działania emulsji pro- i postbiotycznej, na komórki wątroby HepG2. Wyniki uzyskane w ramach prowadzonych badań wskazują, że emulsja pro- i postbiotyczna poprawia żywotność HepG2, hamuje ich apoptozę zarówno w warunkach kontrolnych jak i w insulinooporności. Ponadto emulsja skutecznie łagodziła stres oksydacyjny oraz poprawiała metabolizm i dynamikę mitochondriów. Komórki wątroby poddane działaniu 10% emulsji pro- i postbiotycznej znacznie zmniejszyły aktywację szlaku Fetuina-A/TLR4/JNK/NF-κB, co sugeruje działanie ochronne przed zapaleniem, otyłością oraz insulinoopornością związaną z upośledzoną funkcją wątroby.

W dyskusji Doktorantka w sposób klarowny odniosła swoje wyniki do tych uzyskanych przez innych badaczy w zakresie skuteczności i bezpieczeństwa stosowania astaksantyny jak i probiotyków oraz postbiotyków w warunkach *in vivo* oraz *in vitro* na modelach zwierzęcych oraz ludziach. Wniosek końcowy wynikający z przeprowadzonych przez Doktorantkę badań wskazuje na zasadność i skuteczność stosowania bioaktywnych substancji pochodzenia mikrobiologicznego w walce z chorobami metabolicznymi zaś uzyskane wyniki stanowią silną podstawę do dalszych badań i prewencyjnych metod zapobiegania syndromu metabolicznego u koni.

Podsumowując, bardzo wysoko oceniam przedstawioną mi do recenzji pracę doktorską Pani mgr inż. Malwiny Katarzyny Mularczyk pt. „Astaksantyna i postbiotyki – dwa obiecujące czynniki zwiększające wrażliwość na insulinę w zespole metabolicznym koni.” Ponadto pragnę podkreślić, że Doktorantka podjęła nie tylko nowatorskie badania, ale również badania trudne, które mają wyjaśnić patomechanizm EMS i to co najważniejsze w tej pracy sposoby zapobiegania temu wielowymiarowemu zaburzeniu. Chcę również zwrócić uwagę na fakt, olbrzymiej wiedzy Doktorantki w zakresie podjętego tematu, co odzwierciedla się zwłaszcza w zaprezentowanych pracach przeglądowych.

Moim obowiązkiem jako Recenzenta jest ocena zarówno formy pracy jak i zwrócenie uwagi na pewne braki i niedociągnięcia, które trzeba wziąć pod uwagę przy podejmowaniu kolejnych etapów badań z zakresu EMS:

1. Po pierwsze karotenoidy nieposiadające aktywności prowitaminy A, takie jak likopen, luteina, astaksantyna!!!, kantaksantyna oprócz tego że modulują proliferację komórek, mają bardzo silny wpływ na procesy różnicowania komórek. Wpływ ten związany z indukcją białek związanych z tzw. wielokrotnym różnicowaniem, takich jak inhibitor Cdk, gen odpowiedzi wczesnego wzrostu-1 (EGR-1), Cdk5 i jego białko aktywatorowe czy koneksyna 43, strukturalne białko połączeń szczelinowych. Doktorantka skupiła się w swoich badaniach na niełatwej i skomplikowanej ocenie ekspresji genów kodujących czynniki szlaku fosforylacji oksydacyjnej OXPHOS w mitochondriach, jako wskaźnika różnicowania komórek ASC. W moim mniemaniu należało by również ocenić typowe dla ASC antygeny powierzchniowe, związane z procesem różnicowania. Było by to dużym ułatwieniem diagnostycznym pozwalającym ocenić np. skuteczność terapii koni z EMS.
2. Kontynuując niejako ten wątek, mianowicie wczesnej diagnozy ESM lub wręcz sposobu określenia predyspozycji danego osobnika do tego syndromu, brakuje mi w opublikowanych pracach i w całej dysertacji, wiedzy na temat poziomu osoczowych białek ostrej fazy w przebiegu EMS. Koń z EMS ma uogólnioną reakcję zapalną, z racji uwalnianych z tkanki tłuszczowej a działających endokrynnie cytokin prozapalnych tj. TNF-alfa czy IL-1 oraz reaktywnych form tlenu. Czy nie należałoby w przyszłości skorelować wartości typowych dla koni białek ostrej fazy tj. osoczowy amyloid A czy CRP z zastosowanym leczeniem astaksantyną czy stosowaniem pre- i postbiotyków. Jest to o tyle ciekawe, że nie wszystkie dane literaturowe potwierdzają bezpośredni wpływ EMS na ekspresję genów i białek cytokin zapalnych lub białek ostrej fazy.

3. W badaniach dotyczących wpływu astaksanty na komórki ASC, brakuje w moim odczuciu opisu procesu pozyskiwania tych komórek. Ponadto skoro były to komórki pozyskiwane od koni z EMS, należało podać wiek oraz rasę konia, sposób jego użytkowania oraz wartości parametrów związanych z EMS chociażby osoczowy poziom glukozy czy insuliny. Wymienione wyżej parametry były by niejako tłem do interpretacji uzyskanych przez Doktorantkę wyników *in vitro*.
4. W związku z tym, że znaczna część informacji, umieszczonych zarówno w pracach przeglądowych jak i badawczych odnosi się do zaburzeń wątroby w przebiegu EMS, z uwzględnieniem np. insulinooporności hepatocytów, postępującego steatohepatitis czy uszkodzenia wątroby pod wpływem ROS, nie można zapominać o tym że wątroba jest narządem heterogennym, w którym w w/w zaburzeniach kluczową rolę odgrywają wątrobowe komórki zapalne (kom. Kupffera) czy komórki gwiaździste dla których sygnałem do ich transformacji z komórek magazynujących retinol, do komórek miofibroblastycznych są np. pochodzące z tkanki tłuszczowej a obecne we krwi cytokiny prozapalne oraz wolne rodniki. Należałoby więc w kolejnych etapach badań zastosować nie hodowle statyczne, jednowarstwowe, ale wielowymiarowe tzw. hodowle 3D, pozwalające ocenić interakcje pomiędzy różnymi typami komórek, a tym samym bardziej zbliżone do tkanki wątrobowej jako całości. Alternatywą może być poprowadzenie hodowli pierwotnej, komórek wątroby pobranych od konia z EMS na drodze biopsji. Zdaję sobie jednak sprawę, że nie jest to postępowanie łatwe.
5. W pracy doktorantka używa niefortunnych określeń np. EMC charakteryzuje się zbiorem następujących czynników : miejscową otyłością , insulinoopornością oraz ochwatem- nie są to czynniki ale objawy kliniczne bądź zaburzenia
6. W medycynie posługujemy się pojęciem zmian uogólnionych lub miejscowych a nie regionalnych
7. Wielokrotnie w tekście pracy używane jest określenie „stan zapalny”, podczas gdy zapalenie jest jednym z najbardziej dynamicznych chociaż uporządkowanych procesów, i tak należałoby go określać jako reakcję lub proces, nigdy „stan”.
8. Sugeruję zmienić określenie „obniżanie” apoptozy na hamowanie lub inhibicję apoptozy lub zmniejszenie liczby komórek apoptotycznych.

Wymienione uwagi stanowią głos w dyskusji i nie obniżają w żadnym stopniu wartości zaprezentowanej pracy. Mam też nadzieję, że pomogą Doktorantce w stawianiu sobie nowych

15

zadań badawczych ukierunkowanych na poznanie patomechanizmów EMS i skutecznych sposobów jego zapobiegania.

Przedstawiona do oceny praca mgr inż. Malwiny Katarzyny Mularczyk pt. „Astaksantyna i postbiotyki – dwa obiecujące czynniki zwiększające wrażliwość na insulinę w zespole metabolicznym koni.” stanowi znaczny dorobek naukowy Autorki. Rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 187 ust.1-4 ustawy z dnia 20 lipca 2018 roku Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2023, poz. 742 ze zm.). W związku z powyższym zwracam się do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu z wnioskiem o dopuszczenie mgr inż. Malwiny Katarzyny Mularczyk do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

*Aut. Inż.* 30.10.2023r.

*Marta Wójcik*  
Dr hab. Marta Wójcik, prof. Uczelni