

Warszawa, 02.01.2024 r.

Dr hab. Marcin Gołębiewski, prof. SGGW
Katedra Hodowli Zwierząt
Instytut Nauk o Zwierzętach
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

Recenzja

Rozprawy doktorskiej lek wet. Ariadny Pielok

pt. *„Małe niekodujące RNA jako potencjalne narzędzie diagnostyczne oraz terapeutyczne w insulinooporność”*

„Small non-coding RNSs as potential diagnostic and therapeutic tool in insulin resistance”

Wykonanej pod kierunkiem:

prof. dr hab. Krzysztofa Marycza oraz dr Lukasa Valihracha

Katedra Biologii Eksperymentalnej, Wydział Biologii i Hodowli Zwierząt,
Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

Podstawa prawna oraz ocena formalna

Podstawą formalno-prawną wykonania niniejszej recenzji było pismo z dnia 08.11.2023 r. Przewodniczącej Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu, prof. dr hab. inż. Edyty Kostrzewa-Susłow oraz Uchwała nr 47.2023 NB Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu z dnia 17.10.2023 r. w sprawie wyznaczenia recenzentów w postępowaniu doktorskim lek wet. Ariadny Pielok.

Ocenę rozprawy wykonano zgodnie z wymogami określonymi 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.).

Przesłane materiały zostały starannie przygotowane, umożliwiając zapoznanie się z osiągnięciami naukowymi Doktorantki oraz ich właściwą ocenę.

Problem naukowy i znaczenie badań

Syndrom metaboliczny koni (EMS) to charakterystyczny zbiór objawów klinicznych i zmian kliniczno-patologicznych u koniowatych, który stawia je w grupie wysokiego ryzyka rozwoju ochwatu. Kluczową cechą tego zespołu jest zaburzenie regulacji insuliny. Osobniki dotknięte EMS charakteryzują się zarówno podwyższonym ogólnym wskaźnikiem kondycji (BCS), jak również zwiększonym depozytem tkanki tłuszczowej w okolicach szyi, głowy i ogona. Ochwat, zarówno przewlekły, jak i ostry, jest zjawiskiem powszechnym i występuje nawet do jednej trzeciej populacji koniowatych. Głównym objawem kliniczno-patologicznym EMS jest hiperinsulinemia z prawidłowym stężeniem glukozy we krwi (rozregulowanie poziomu insuliny). Inne powiązane objawy kliniczne obejmują niepłodność, zmienioną aktywność jajników, obrzęk narządów rozrodczych i zwiększony apetyt.

Etiologia EMS nie jest do końca poznana, dlatego badania dotyczące nowych metod diagnostyki tego schorzenia mogą przyczynić się nie tylko do lepszego poznania biologicznych mechanizmów patofizjologii tego zjawiska, jak również mogą mieć pozytywne implikacje dla praktyki weterynaryjnej. Dlatego, szczególnie interesującym aspektem przedstawionej dysertacji doktorskiej jest wykorzystanie potencjalnych biomarkerów insulinooporności i syndromu metabolicznego, w tym nie kodujących RNA (ncRNS; *non-coding RNAs*), takich jak miRNA (micro-RNA) oraz lncRNA (długie niekodujące RNA; *long non-coding RNS*).

Ze względu na fakt, że jednym z najistotniejszych powikłań towarzyszących występowaniu EMS u koni jest ochwat - schorzenie obniżające dobrostan - poza działaniami profilaktycznym, konieczne jest poszukiwanie nowych metod terapeutycznych EMS. Spośród nowoczesnych strategii terapeutycznych najlepiej rokującymi w leczeniu ochwatu jest min. wykorzystanie komórek macierzystych oraz osocza bogatopłytkowego. Podstawowym założeniem terapii z wykorzystaniem różnych populacji komórek macierzystych jest zaktywizowanie procesów naprawczych w komórkach oraz tkankach pacjentów.

W związku z powyższym, podjęta przez Autorkę tematyka bardzo dobrze wpisuje się w obecną problematykę, zarówno na poziomie badań, jak i ich implementacji do praktyki, dotyczącą poszukiwania nowoczesnych biomarkerów insulinooporności oraz opracowania izolacji oraz charakterystyki komórek progenitorowych korony rogowatej kopyta jako potencjalnej terapii ochwatu.

Opis i ocena pracy

Przedłożona do oceny rozprawa doktorska lek wet. Ariadny Pielok jest zbiorem publikacji pod wspólnym tytułem pt. „**Małe niekodujące RNA jako potencjalne narzędzie diagnostyczne oraz terapeutyczne w insulinooporności**”, w której skład wchodzi 4 oryginalne prace twórcze.

Zbiór publikacji naukowych wchodzących w skład dysertacji doktorskiej:

1. Pielok A., Marycz K.: Non-Coding RNAs as Potential Novel Biomarkers for Early Diagnosis of Hepatic Insulin Resistance. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21, 4182; doi:10.3390/ijms21114182.
2. Marycz K., Pielok A., Kornicka-Garbowska K.: Equine Hoof Stem Progenitor Cells (HPC) CD29 + /Nestin + /K15 + – a Novel Dermal/epidermal Stem Cell Population With a Potential Critical Role for Laminitis Treatment. *Stem Cell Reviews and Reports*, 2021, 17, s. 1478–1485, <https://doi.org/10.1007/s12015-021-10187-x>.
3. Pielok A., Kępska M., Steczkiewicz Z., Grobosz S., Bourebaba L., Marycz K.: Equine Hoof Progenitor Cells Display Increased Mitochondrial Metabolism and Adaptive Potential to a Highly Pro-Inflammatory Microenvironment. 2023, 17, 4, s. 11446. <https://doi.org/10.3390/ijms241411446>.
4. Pielok A., Króliczewski J., Kępska M., Marycz K.: A Comparative Study of Equine Hoof Progenitor Cells and Adipose-Derived Stem Cells in Hyperinsulinemia, doi: 10.20944/preprints202309.1605.v1.

Trzy z wymienionych wyżej publikacji zostały opublikowane w recenzowanych czasopismach naukowych, indeksowanych przez *Journal Citation Report*, posiadających następujące parametry bibliometryczne:

- 2 – publikacje: *International Journal of Molecular Sciences* – 140 pkt., IF (5) – 6,2;
- 1 – publikacja: *Stem Cell Reviews and Reports* – 100 pkt., IF (5) – 4,7;
- 1- publikacja: preprint.

Łącznie wskazane prace charakteryzują się bardzo wysokimi parametrami bibliometrycznymi: 380 pkt. oraz IF (5) - 17,1.

Wspomniane wyżej parametry bibliometryczne przedstawionych publikacji są mierzalne, obiektywne i jednoznacznie świadczą o wysokiej jakości i znaczeniu dla nauki wyników badań zawartych w rozprawie doktorskiej Ariadny Pielok.

Oceniając przesłany zbiór publikacji naukowych wchodzących w skład dysertacji doktorskiej należy stwierdzić, że stanowią one nowatorskie i bardzo wartościowe prace badawcze. W mojej ocenie nieco mylący dla czytelnika może być wspólny tytuł tj. „**Małe niekodujące RNA jako potencjalne narzędzie**

diagnostyczne oraz terapeutyczne w insulinooporności”, który nieco pomija zagadnienia związane z charakterystyką oraz rolą progenitorowych komórek korony rogowatej kopyt w terapii ochwatu koni.

W trzech publikacjach Doktorantka była pierwszym autorem, a w jednej drugim. Załączone oświadczenia świadczą o znaczącym wkładzie Autorki w przygotowywane prace. Udział Doktorantki obejmował analizę literatury, przygotowanie tabel i grafik, pozyskaniu materiału biologicznego do badań, hodowli komórkowych, bardzo zróżnicowanych analiz laboratoryjnych, w tym RT-qPCR, cytometrii przepływowej, analizę danych, przygotowaniu tekstu manuskryptów, oraz polemice z recenzentami.

Wartym podkreślenia jest fakt, że przeprowadzone prace badawcze sfinansowane zostały w ramach projektów:

1. „Inhibicja fosfatazy tyrozynowej jako strategia uwrażliwiania na insulinę poprzez aktywację autofagii chaperonowej oraz wyciszenie odczynu zapalnego i stresu komórkowego wątroby koni z syndromem metabolicznym (EMS)”. Opus 15 2018/29/B/NZ7/02662. Kierownik: prof. dr hab. Krzysztof Marycz.
2. UPWR 2.0: międzynarodowy i interdyscyplinarny program rozwoju Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu współfinansowanego ze środków Europejskiego Funduszu społecznego w ramach Programu Operacyjnego Wiedza Edukacja Rozwój, na podstawie umowy nr POWR.03.05.00-00-Z062/18 z dnia 4 czerwca 2019 r.

Integralną częścią rozprawy doktorskiej jest 48 stronicowe opracowanie, w którym wyodrębnione zostały następujące rozdziały: strona tytułowa, spis treści, wykaz publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej, wykaz skrótów, streszczenia, wstęp, cel pracy, hipoteza badawcza, komentarze do publikacji, dyskusja, wnioski, literatura, oświadczenia i publikacje stanowiące przedmiot rozprawy doktorskiej.

Streszczenia oraz Wstęp

Autorka przedstawiła streszczenia w języku polski i angielskim. Dobre streszczenie powinno zawierać: 1 zdanie wstępu, cel pracy, kilka zdań dotyczących metodologii, opis najważniejszych wyników oraz 1 zdanie podsumowania. W mojej opinii zbyt dużo treści streszczeń zostało skonsumowane na przedstawienie tła badań, a zbyt mało w kontekście metodyki i podsumowania wyników badań wszystkich przedstawionych do oceny publikacji.

Doktoranta w oparciu o dobrze wybraną literaturę na 8 stronach, nakreśliła problem badawczy i uzasadniła potrzebę podjęcia badań. Autorka szczegółowo opisała tło swoich badań traktując je wieloaspektowo: od charakterystyki tła metabolicznego wystąpienia insulinooporności, poprzez opis patofizjologii syndromu metabolicznego koni i ochwatu, wykorzystania komórek macierzystych w terapii syndromu metabolicznego koni, na charakterystyce biomarkerów RNA i ich potencjalnym znaczeniu w

diagnozie syndromu metabolicznego kończąc. Świadczy to o dobrym przygotowaniu Doktorantki do pracy badawczej i dużym własnym zaangażowaniu przy tak szczegółowym studiowaniu literatury. W opracowaniu wykorzystano bowiem aż 130 pozycji literatury, z czego ponad 2/3 zostało opublikowanych w ciągu ostatnich 15 lat. To potwierdza dobre usytuowanie podjętej tematyki na tle współcześnie prowadzonych badań.

Na tym etapie nasuwa mi się mała uwaga dotycząca pierwszej części wstępu, gdzie przedstawione zostało tło metaboliczne wystąpienia insulinooporności. W tej części odnoszono się głównie do populacji ludzkiej, a zabrakło nawiązania do koni w kontekście dalszej tematyki związanej z syndromem metabolicznym u tego gatunku.

Cel pracy i Hipoteza badawcza

Cel badań oraz cele szczegółowe zostały przedstawione jasno i precyzyjnie. Mam jednak kilka technicznych uwag, co do konstrukcji hipotez badawczych, które w moim przekonaniu powinny nawiązywać do celów szczegółowych i wskazywać jakie analizy, w tym statystyczne będą wykonane. W przedstawionym opracowaniu sformułowano hipotezę dotyczącą pierwszego celu szczegółowego oraz dwóch przedostatnich. Dlaczego pominięto pozostałe?

Komentarze do publikacji

W rozdziale komentarze do publikacji Doktorantka przedstawiła streszczenia opracowań przestawionych jako zbiór publikacji naukowych wchodzących w skład dysertacji doktorskiej.

Ad. 1. Pierwsza publikacja miała charakter przeglądowy. Autorka wraz z zespołem dokonała przeglądu niekodujących odcinków RNA, które mogą być wykorzystane jako biomarkery w diagnostyce insulinooporności wątrobowej. Doktorantka wyselekcjonowała 6 transkryptów: 3 miRNA i 3 lncRNA na podstawie wyników badania krwi pacjentów w stanie przedcukrzycowym. Dodatkowo na bazie dostępnej literatury przeanalizowana została wartość prognostyczna wybranych transkryptów. Oceniam wysoko merytoryczny poziom publikacji. Moja uwaga dotyczy zbyt małego nawiązania do zjawiska insulinooporności u koni.

Ad. 2. Publikacja ta ma charakter badawczy. Jej celem było przedstawienie procesu izolacji oraz charakterystykę komórek HPC wyizolowanych z korony rogowatej kopyt końskich. Charakterystyka HPC obejmowała badania z wykorzystaniem RT-qPCR, cytometrii przepływowej oraz z wykorzystaniem mikroskopii świetlnej, konfokalnej oraz elektronowej. Badania wykazały, że pozyskane komórki HPC charakteryzują się wysoką proliferacją *in vitro* oraz plastycznością i mogą brać udział w patofizjologii ochwatu koni. W odniesieniu do tej publikacji mam kilka uwag dotyczących pozyskanego materiału

badawczego. Tkanki do dalszych badań zostały pobrane od 6 źrebiąt, które zostały ubite w ubojni, czy poddane eutanazji, a jeśli tak to z jakich powodów? Brak jest również w artykule informacji dotyczących tych zwierząt tj. wiek, kondycja, masa ciała, rasa. Pozostałe procedury zostały opisane bardzo szczegółowo.

Ad.3. Kolejna publikacja stanowi rozszerzenie poprzedniej. Celem badań było porównanie populacji komórek HPC z ASC pod kątem ekspresji kluczowych markerów metabolicznych zarówno w warunkach standardowych, jak i środowisku prozapalnym. Analizie poddane zostały parametry fenotypu, metabolizm, dynamika mitochondrialna, stres oksydacyjny, apoptoza oraz immunomodulacja. Badania wykazały, że w warunkach prozapalnych ekspresja biomarkerów miRNA była znacznie obniżona w komórkach HPC, co wykazuje na ich możliwe wykorzystanie diagnostyczne. Podobnie jak w poprzednim artykule nieco niejasny jest sposób pozyskania materiału badawczego. Czy badane 2 osobniki zostały ubite, czy poddane eutanazji?

Ad. 4. Z kolei w ostatniej publikacji porównano komórki HPC oraz ASC w warunkach standardowych oraz imitujących hiperinsulinemię. Wykonano szeroki panel analiz włączając proliferację, metabolizm, dynamikę mitochondrialną, stres oksydacyjny, apoptozę zapalenie, ścieżkę insulinową oraz ekspresję wybranego panelu miRNA. Wyniki wykazały, że komórki HPC i APS wykazywały podobną dynamikę zmian w warunkach hiperinsulinemii, jednak wykazały inną ekspresję dla zastosowanego panelu miRNA. Umożliwia to potencjalne wykorzystanie tego panelu do celów diagnostycznych.

Układ oraz zakres przeprowadzonych doświadczeń oraz wykorzystane metody analityczne wskazują na duże zaangażowanie Doktorantki, która wykazała się dużymi kompetencjami, aby je zrealizować.

Dyskusja

Doktorantka w ocenianej pracy rzeczowo omawia uzyskane wyniki na tle dobrze dobranego piśmiennictwa. Nie mam dodatkowych uwag do tej części pracy.

Wnioski

Rozdział wnioski powinien logicznie nawiązywać do postawionych celów oraz hipotez badawczych i stanowić syntezę przeprowadzonych badań. Postawione przez Doktorantkę wnioski są trafne i wynikają z przeprowadzonych badań.

Ocena końcowa

Przedstawiona mi do oceny rozprawa stanowi rzetelne i aktualne, wieloaspektowe źródło wiedzy z zakresu możliwości wykorzystania niekodujących odcinków RNA w diagnostyce syndromu metabolicznego koni oraz potencjału terapeutycznego komórek HPC w terapii ochwatu. Jest całościowym i oryginalnym rozwiązaniem problemu badawczego i jednocześnie dowodem rozległej i ugruntowanej wiedzy Autorki. Przedstawione przez mnie uwagi/prośby o doprecyzowanie w żaden sposób nie wpływają na wartość merytoryczną opracowania, a wynikają z obowiązków recenzenta.

Reasumując stwierdzam, że przedłożona mi do oceny rozprawa doktorska w pełni odpowiada wymogom stawianym rozprawom doktorskim określonym 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 na tej podstawie przedkładam Radzie Naukowej Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu wniosek o dopuszczenie lek wet. Adriany Pielok do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Pragnę podkreślić, że przedstawiona do recenzji dysertacja doktorska lek wet. Ariadny Pielok charakteryzuje się wysokim poziomem merytorycznym i naukowym. Rozprawa wnosi istotny wkład w rozwój Dyscypliny Nauki Biologiczne oraz posiada duży potencjał aplikacyjny. Realizacja tak rozległych badań wymagała dużego zaangażowania Doktorantki, doskonałej współpracy naukowej oraz świetnej znajomości nowoczesnych technik i metod badawczych. Dlatego też, przedkładam Radzie Naukowej Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu wniosek o jej wyróżnienie.

.....
dr hab. Marcin Gołębiewski, prof. SGGW