

Dr hab. Michał Skibniewski
Katedra Nauk Morfologicznych
Instytut Medycyny Weterynaryjnej
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

Warszawa, dn. 22.12.2023 r.

Recenzja

rozprawy doktorskiej lek. wet. Ariadny Pielok
pt. „Małe niekodujące RNA jako potencjalne narzędzie diagnostyczne oraz terapeutyczne
w insulinooporności”,

wykonanej pod kierunkiem Prof. dra hab. Krzysztofa Marycza oraz Phd Lukáša
Valihracha

w Katedrze Biologii Eksperymentalnej
na Wydziale Biologii i Hodowli Zwierząt
Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu

Podstawę formalną wykonania recenzji stanowi pismo z dnia 8 listopada 2023 r.
(BDDD0000.NB.4100.21.2023), Przewodniczącej Rady Naukowej Dyscypliny Nauki
Biologiczne Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu,
prof. dr hab. inż. Edyty Kostrzewy-Susłow.

1. Informacja o ocenianej rozprawie doktorskiej

Przedłożona do oceny praca składa się z cyklu czterech, spójnych tematycznie, artykułów o łącznym współczynniku wpływu (IF) wynoszącym 18,216 oraz liczbie punktów MEIN równej 380. Należy zauważyć, że opisane powyżej wskaźniki naukometryczne są wysokie i odnoszą się do trzech artykułów cyklu, które ukazały się w czasopismach naukowych indeksowanych w JCR, ujętych w wykazie sporządzonym zgodnie z przepisami wydanymi na podstawie art. 267 ustawy z dnia 20 lipca 2018, tj. znajdowały się na liście czasopism

punktowanych, stanowiących załącznik do komunikatu Ministra Edukacji i Nauki z dnia 9 lutego 2021 oraz z dnia 17 lipca 2023 – w odniesieniu do pracy z roku bieżącego. Czwarta publikacja cyklu została dołączona w formie tzw. preprintu, który obecnie znajduje się w repozytorium na stronie internetowej preprints.org.

Podstawę do ubiegania się o stopień naukowy doktora stanowią następujące prace:

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, 11: 1-19; DOI: 10.3390/ijms21114182.

Marycz K., **Pielok A.**, Kornicka-Grabowska 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, 4: 1478-1485; DOI: 10.1007/s12015-021-10187-x

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. *Int. J. Mol. Sci.* 2023, 24, 11446. DOI: 10.3390/ijms241411446

Pielok A., Króliczewski J., Kępska M., Marycz K.: A Comparative Study of Equine Hoof Progenitor Cells and Adipose-Derived Stem Cells in Hyperinsulinemia. *Preprints 2023*, DOI: <https://doi.org/10.20944/preprints202309.1605.v1>

Z treści załączonych oświadczeń oraz danych zawartych w wymienionych wyżej publikacjach wynika, że Pani lek. wet. Ariadna Pielok miała wiodący udział w powstaniu każdej z nich. W pierwszej, trzeciej oraz czwartej publikacji była pierwszym autorem oraz pełniła rolę autora korespondującego. Treść załączonych oświadczeń precyzyjnie definiuje merytoryczny udział Doktorantki w każdej pracy natomiast trudno zweryfikować oświadczenie o polemice z recenzentami w przypadku czwartej publikacji cyklu, ponieważ z informacji znajdującej się na stronie preprints.org wynika, że praca została przesłana 22 września (w dniu złożenia oświadczenia), natomiast do dnia 25 września 2023 r, tj. do czasu umieszczenia jej w zasobach internetowych nie była poddawana procedurze recenzji, co zaznaczono adnotacją: „*not peer-reviewed*”. Niemniej jednak należy podkreślić, że publikowanie tzw. preprintów jest powszechną praktyką pozwalającą na trwałą dokumentację wyników badań naukowych w czasie gdy praca przechodzi, nierzadko długotrwały, proces recenzji i cyklu redakcyjnego. Mając nadany numer DOI jest ona obecna w zasobach internetowych

rozstrzygając o pierwszeństwie w zakresie badań, szczególnie mających pionierski charakter. Z tego powodu uznane instytucje światowe, zajmujące się finansowaniem badań naukowych, takie jak: US National Institutes of Health i Wellcome Trust akceptują cytowanie preprintów we wnioskach o dotacje.

Biorąc pod uwagę nowatorski charakter badań Doktorantki dołączenie preprintu pracy do cyklu artykułów, stanowiącego podstawę do ubiegania się o stopień naukowy doktora, jest w pełni uzasadnione.

Ocena merytoryczna

Tematyka podjętych badań jest niezwykle ciekawa, ponieważ dotyczy zagadnień związanych z zespołem metabolicznym w kontekście poszukiwania markerów umożliwiających jego wczesną diagnostykę oraz roli komórek macierzystych w patogenezie choroby i poszukiwania możliwości ich potencjalnego wykorzystania w terapii ochwatu u koni. Mimo, że badania dotyczą zmian u koni to ich znaczenie należy rozpatrywać w znacznie szerszym kontekście, ponieważ obszar badań Pani lek. wet. Ariadny Pielok jest ważny społecznie i ściśle związany z problemami współczesnego świata zmagającego się z narastającą liczbą przypadków zespołu metabolicznego u ludzi. Dane krajowe wskazują, że częstość występowania zespołu metabolicznego wzrasta w osi czasu. Na początku lat dwutysięcznych szacowano, że co piąty mieszkaniec Polski w wieku 20-74 lata miał objawy zespołu metabolicznego, podczas gdy w badaniach z roku 2014 jego obecność stwierdzono już u 33% kobiet i 39% mężczyzn. Podobne obserwacje dotyczą innych rejonów świata dlatego, w opinii recenzenta, z uznaniem należy się odnieść do aktywności naukowej Doktorantki. Mimo, że badania dotyczą gatunku taksonomicznie odległego od człowieka mają istotny wkład w uzupełnienie obecnego stanu wiedzy na temat zespołu metabolicznego. Próba ustalenia skutecznych metod wczesnej diagnostyki wymienionych zaburzeń oraz roli komórek macierzystych w ich przebiegu stanowi niezwykle cenny wkład w rozwój nauk biologicznych i weterynaryjnych, zwłaszcza w odniesieniu do ich związku z najczęściej występującą chorobą narządu palcowego (tła nieurazowego) u koniowatych jakim jest ochwat. Mimo, że jest to choroba znana od momentu udomowienia konia, wciąż stanowi ważny problem kliniczny. Ochwat nie doczekał się w pełni efektywnych metod leczenia i w ciężkich przypadkach jest przyczyną eutanazji zwierząt.

Doktorantka jasno określiła hipotezy badawcze oraz cele badań, które pozwoliły zweryfikować przyjęte założenia, że miRNA oraz lncRNA mogą stanowić czułe i swoiste

markery insulinooporności, szczególnie tła wątrobowego oraz, że analiza sekretomu miRNA komórek macierzystych korony kopyta (HPC) może być źródłem informacji na temat przebiegu ochwatu.

Pierwszą publikacją cyklu jest praca przeglądowa, która ukazała się w roku 2020. Stanowi ona obszerne omówienie stanu aktualnej wiedzy na temat możliwości zastosowania analizy transkryptów miRNA oraz lncRNA we wczesnej diagnostyce insulinooporności wątrobowej. Jest ona doskonałym wprowadzeniem do zrozumienia ich wartości diagnostycznej a także aktywności regulacyjnej w ścieżce sygnałowej insuliny w wątrobie. Na podstawie przeglądu 116 pozycji piśmiennictwa Doktorantka wyselekcjonowała 6 transkryptów mających potencjalną wartość diagnostyczną ze względu na ich zmieniający się poziom u pacjentów w stanie przedcukrzycowym oraz u pacjentów z cukrzycą typu 2 i obciążonych zespołem metabolicznym.

Dругa publikacja dotyczyła metodyki izolacji oraz charakterystyki komórek macierzystych korony kopyta (HPC – hoof progenitor cells). Morfologia wymienionych komórek została określona z wykorzystaniem mikroskopii świetlnej, konfokalnej oraz elektronowej z uwzględnieniem analizy obecności wybranych białek cytoszkieletu. Zastosowanie cytometrii przepływowej oraz RT-qPCR umożliwiło analizę ekspresji markerów powierzchniowych oraz markerów charakteryzujących komórki macierzyste, takich jak białka: SOX2, OCT4 oraz NANOG, mające między innymi zdolność do aktywacji transkrypcji genów miRNA. Wyniki przeprowadzonych badań pozwoliły stwierdzić, że komórki HPC mają wysoki potencjał proliferacyjny w warunkach *in vitro* oraz cechują się plastycznością zbliżoną do macierzystych komórek mezenchymalnych (MSC). Na tej podstawie Autorzy pracy przyjęli założenie, że w związku z lokalizacją wymienionych komórek oraz ich wysoką aktywnością proangiogenną oraz immunosupresyjną mogą w przyszłości mieć one zastosowanie w leczeniu ochwatu.

Trzecia praca dotyczyła porównania komórek HPC z dobrze już poznanymi i scharakteryzowanymi komórkami macierzystymi tkanki tłuszczowej (ASC). Niezwykle istotnym elementem badań była analiza komórek utrzymywanych w warunkach prozapalnych, pozwalających naśladować środowisko tkankowe w trakcie ochwatu. Zbadano ekspresję wybranych markerów fenotypowych, metabolizm, aktywność mitochondrialną, stres oksydacyjny oraz apoptozę. Dodatkowo, analizie poddano morfologię wymienionych komórek oraz ich zdolność do migracji. Stwierdzono, że mimo podobnej morfologii oba typy komórek macierzystych utrzymywanych w standardowej hodowli oraz w warunkach prozapalnych różnią się istotnie ekspresją markerów apoptozy, immunomodulacji oraz aktywnością

mitochondrialną. Wyniki przeprowadzonych obserwacji pozwoliły na przyjęcie założenia, że prawdopodobnie komórki HPC mogą mieć być bardziej pomocne w leczeniu ochwatu z powodu ich mniejszej zdolności do uwalniania metaloproteinaz powodujących uszkodzenia macierzy pozakomórkowej.

Czwarta publikacja cyklu stanowi kontynuację trzeciej pracy. Dotyczy ona porównania aktywności komórek HPC oraz ASC w warunkach imitujących hiperinsulinemię. Autorzy pracy stwierdzili, że HPC cechują się większą odpornością na podwyższony poziom insuliny stąd można przypuszczać, że będą wykazywały większą niż ASC przydatność w leczeniu ochwatu u koni obciążonych zespołem metabolicznym.

Podsumowując należy stwierdzić, że przedstawiony do oceny cykl prac prezentuje wyniki nowatorskich badań poświęconych rozwiązaniu oryginalnego problemu naukowego mającego potencjalne wartości aplikacyjne. Artykuły są spójne tematycznie, uzupełniają się wzajemnie, stanowiąc obszerne opracowanie na temat możliwości wykorzystania niekodujących RNA w roli precyzyjnych markerów chorób metabolicznych oraz potencjału komórek HPC w roli czynników terapeutycznych. Badania zostały przeprowadzone wielokierunkowo z wykorzystaniem nowoczesnych narzędzi gwarantujących wiarygodność uzyskanych wyników, a wnioski płynące z poszczególnych analiz są spójne, logiczne i w pełni uzasadnione. W związku z powyższym należy bardzo wysoko ocenić osiągnięcie naukowe Pani lek. wet. Ariadny Pielok.

Rozprawa zawiera jednak pewne nieścisłości. W rozdziale „*Materials and methods*” drugiej publikacji cyklu, w podrozdziale zatytułowanym „*Tissue harvest and cell culture*” istnieje następujący opis koni, od których pozyskano materiał badawczy, cyt: „*Samples of coronary corium tissue were collected post-mortem from 6 foals, at a local slaughterhouse. The animals were euthanized for reasons unrelated to this study*”. W związku z obowiązującymi przepisami weterynaryjnymi zacytowane wyżej zdania pozostają w wyraźnej sprzeczności bowiem inaczej definiuje się ubój, a zupełnie inaczej eutanazję zwierzęcia. Wymienione w artykule źrebięta znajdowały się w ubojni, a zatem podlegały ubojowi, a nie eutanazji, która jest procedurą odnoszącą się do humanitarnego zakończenia życia skrajnie cierpiącego zwierzęcia w warunkach braku możliwości trwałej poprawy stanu jego zdrowia. Podobny błąd został powielony w trzeciej publikacji cyklu, gdzie w podrozdziale 4.3. zatytułowanym również „*Tissue harvest and cell culture*” widnieje następujący opis, cyt. „*Samples of coronary corium and adipose tissue were acquired post-mortem from 6 young horses of random sexes, aged between 1-2 years, at the local slaughterhouse. The reasons for the animals' eutanasia were*

unrelated to this study. Before the slaughter, the good health and condition of the animals was ensured based on a mandatory clinical examination performed by a veterinarian". W tym przypadku także drugie zdanie cytatu przeczy pierwszemu i trzeciemu. Dodatkowo, w rozdziale 4.1. zatytułowanym „*Study design*” wymieniono 2 młode konie, od których materiał pobrano w ubojni oraz 8-letnią klacz, od której pobrano próbki tkanki tłuszczowej z okolicy nasady ogona. W związku z powyższym powstaje pytanie od ilu zwierząt łącznie pobrano materiał stanowiący podstawę trzeciej publikacji cyklu? Pozostałe drobne nieścisłości są głównie wynikiem zapożyczeń z języka angielskiego, w którym opublikowano cykl prac stanowiących podstawę do ubiegania się o stopień doktora lub błędów edytorskich. Ich obecność jest rzeczą całkowicie naturalną, podobnie jak trudność z ich uchwyceniem przez piszącego dzieło. Mają one charakter marginalny, nie wpływający na końcową, bardzo wysoką ocenę pracy, lecz obowiązkiem recenzenta jest ich wskazanie. Mimo, iż język angielski stał się międzynarodowym standardem obowiązującym w publikacjach naukowych anglicyzmy nie powinny znajdować się w rozdziałach pracy napisanych w języku polskim. Trudno zgodzić się ze stwierdzeniem Doktorantki, że 25% populacji ludzi na świecie przekłada się na „*bilion zachorowań*”, ponieważ obecnie liczba ludności na świecie osiągnęła 8 miliardów i jest daleka od biliona (10^{12}). Zakładam, że jest to zapożyczenie z języka angielskiego, gdzie terminem *billion* określa się liczbę, której nazwa w języku polskim brzmi miliard (10^9). Uporządkowania wymagają też zastosowane miana anatomiczne i niektóre określenia kliniczne. Wprawdzie ochwat bywa wskazaniem do eutanazji ale zdecydowanie nie jest śmiertelną chorobą koni. Należy także uporządkować nazewnictwo okolicy ciała, z której pobierano komórki HPC, ponieważ w celu pracy (strona 21 maszynopisu, wiersz 5) określono ją mianem „*korony rogotwórczej kopyta*” natomiast w punkcie 2 celów szczegółowych (strona 21 maszynopisu, wiersze 10 i 11) jest już ona opisana jako „*koronka kopyt końskich*”. Opis anatomii narządu palcowego konia w języku polskim jest szczególnie trudny (odmiennie niż w języku angielskim) niemniej jednak obie struktury są wyraźnie różnicowane przez morfologów, pełnią inne funkcje i powinny być precyzyjnie zdefiniowane w treści pracy. Określenie *coronary corium* odnosi się do skóry właściwej korony (łac. *corium coronae*) jednak na rycinie 1A w drugiej publikacji cyklu zaznaczono zarówno koronę jak i obwódkę (koronkę). Analiza treści pracy wyraźnie ukazuje rozbieżność między tekstem w języku polskim oraz fragmentami w języku angielskim, a stosowane uproszczenia i skróty myślowe przybierają formę niekoniecznie zgodną z intencjami Autorki. Na stronie 20 pracy w wierszach 27 i 28 znajduje się zdanie, które pozwolę sobie zacytować: „*Zarówno miRNA jak i lncRNA zostały rozpoznane jako uniwersalne biomarkery w chorobach takich jak Alzheimer* ⁹²,”. W tym przypadku

zastosowanie potocznego określenia przewlekłej, postępującej choroby neurozwyrodnieniowej spowodowało, że znakomity niemiecki psychiatra Alois Alzheimer, zmarły w roku 1915 profesor Uniwersytetu Wrocławskiego, został określony mianem choroby. Tymczasem źródło piśmiennictwa, które w tym miejscu cytuje Doktorantka wyraźnie wskazuje, że chodzi o chorobę Alzheimera „*Alzheimer disease*”. W tym miejscu należy jednak jeszcze raz podkreślić, że są to błędy drobne, niedecydujące o wysokiej jakości pracy doktorskiej Pani Lek. wet Ariadny Pielok.

Wniosek końcowy

W podsumowaniu stwierdzam, że przedstawiona do oceny dysertacja doktorska stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego. Jednoznacznie wskazany indywidualny, znaczący wkład Kandydatki do stopnia doktora w realizację badań, wykonanie części eksperymentalnej oraz opracowanie i interpretację wyników potwierdza wiedzę teoretyczną Doktorantki z zakresu dyscypliny nauki biologiczne, a także świadczy o umiejętności planowania i realizacji zaawansowanych badań naukowych.

Stwierdzam, że rozprawa doktorska lek. wet. Ariadny Pielok spełnia warunki 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.).

Mając powyższe na uwadze, przedstawiam Wysokiej Radzie Naukowej Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu wniosek o dopuszczenie lek. wet. Ariadny Pielok do dalszych etapów postępowania doktorskiego.

Uznając wysoką wartość recenzowanej rozprawy, wagę podjętej problematyki, szeroki zakres przeprowadzonych badań oraz wysokie wskaźniki naukometryczne publikacji wchodzących w skład osiągnięcia składam do Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu wniosek o wyróżnienie dysertacji.