

prof. dr hab. Anna Korzekwa
Zakład Ochrony Bioróżnorodności
Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności
Polskiej Akademii Nauk w Olsztynie

Popielno, 30 listopada 2023 r.

**Recenzja rozprawy doktorskiej lek. wet. Ariadny Pielok
pt. „Male niekodujące RNA jako potencjalne narzędzie diagnostyczne oraz terapeutyczne
w insulinooporności” wykonanej w Katedrze Biologii Eksperymentalnej
na Wydziale Biologii i Hodowli Zwierząt
Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu
pod kierunkiem promotorów
prof. dr hab. Krzysztofa Marycza oraz dra Lukáša Valihracha**

Recenzja została wykonana w oparciu o uchwałę Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu (nr 47.2023.NB), podjętą w dniu 17 października 2023 r. w związku z postępowaniem wszczętym celem nadania Pani lek. wet. Ariadnie Pielok stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne. Recenzja uwzględnia wymagania określone w art. 187 ust. 1-4 z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym (Dz. U. z 2023, poz. 1668 ze zm.).

Ogólna charakterystyka i formalna ocena rozprawy doktorskiej

Rozprawa doktorska dotyczy problemu insulinooporności u koni, który jest coraz częściej diagnozowany i może mieć poważne, negatywne konsekwencje, takie jak zespół metaboliczny (*Equine Metabolic Syndrom* - EMS). Wciąż poznawana patofizjologia EMS jest efektem współdziałania wielu czynników, w tym genetycznych i środowiskowych. Charakteryzuje się występowaniem otyłości, insulinooporności oraz zapalenia tworzywa kopytowego (*laminitis*, ochwat). Na zwiększającą się liczbę potwierdzonych przypadków insulinooporności u koni nie bez wpływu pozostaje coraz szersza diagnostyka. Doktorantka zaproponowała w swojej rozprawie doktorskiej niekodujące RNA: długie niekodujące RNA (lncRNA) i mikroRNA (miRNA) oraz komórki macierzyste korony rogotwórczej (HPC) jako nowatorskie narzędzia do wykorzystania przy EMS.

W niekodujących fragmentach RNA, stanowiących ok. 98 % całego DNA znajduje się informacja kodująca cząsteczki regulacyjne, którymi m.in. są lncRNA oraz krótsze od nich

miRNA. Ostatnie lata przyniosły szereg doniesień o zmianach w ekspresji miRNA w różnych zaburzeniach, w tym metabolicznych, wydzielania insuliny i rozwoju komórek wysp trzustkowych. Ze względu na fakt, że miRNA są odporne na działanie RNazy i pozostają stabilne w tkankach i płynach ustrojowych, mogą być specyficznymi wskaźnikami zaburzeń metabolicznych. O roli lncRNA wciąż wiemy niewiele, ale podejmowane są próby ustanowienia ich jako celu terapeutycznego, np. w diagnostyce i leczeniu raka jajnika.

Poza próbą określenia roli niekodujących fragmentów RNA w insulinooporności u konia, Doktorantka założyła, że mezenchymalne HPC biorą udział w patofizjologii ochwatu i powiązała ich udział z analizą reakcji na proces zapalny oraz sekretomiu niekodujących fragmentów RNA. Istnieją jednak specyficzne cechy molekularne oraz potencjał terapeutyczny mezenchymalnych komórek macierzystych, w zależności od tkanki źródłowej. Komórki mezenchymalne izolowane z tkanki tłuszczowej (ASC) są stosunkowo łatwe do pozyskania, izolacji, ale ich fenotyp i genotyp może się różnić od tych bytujących w warstwie rogowatej kopyta (w koronie),⁺ gdzie dochodzi do ochwatu. Dobranie odpowiedniej populacji komórek macierzystych może mieć zatem znaczenie w celu zrozumienia patofizjologii syndromu metabolicznego koni, w tym ochwatu, a docelowo do opracowania terapii i diagnostyki tych schorzenia u koni.

Rozprawa doktorska składa się trzech opublikowanych artykułów naukowych, poprzedzonych Wstępem przybliżającym tematykę badań, nakreśleniem Celu pracy, sformułowaniem Hipotez badawczych oraz Komentarzem do osiągnięć opisanych w załączonych pracach. Po komentarzu do publikacji Doktorantka zamieściła rozdział Dyskusja oraz Wnioski. W rozprawie znajdują się ponadto Spis skrótów i literatury.

Chociaż Doktorantka wyszczególniła cztery publikacje, jako wchodzące w skład rozprawy doktorskiej, to ostatnia z nich nie została opublikowana i ze względu formalnego nie może być zaliczona (*Pielok Ariadna, Króliczewski Jarosław, Kępska Martyna, Marycz Krzysztof: A comparative Study of Equine Hoof Progenitor Cells and Adipose-Derived Stem Cells in Hyperinsulinemia*).

Pani lek. wet. Ariadna Pielok jest pierwszym autorem w dwóch spośród trzech publikacji, a w trzeciej drugim autorem. Jej udział w powstaniu manuskryptów jest dominujący, zgodnie z zamieszczonymi oświadczeniami. Wyniki pracy zostały zamieszczone w recenzowanych czasopismach o wysokim współczynniku wpływu. Pierwsza publikacja wchodząca w skład rozprawy doktorskiej jest pracą przeglądową, opublikowaną w czasopiśmie „International Journal of Molecular Sciences” o IF=5,924 (zgodnie z rokiem publikacji, MEIN – 140), druga praca eksperymentalna została opublikowana w czasopiśmie „Stem Cell Reviews

and Reports” o IF=6,692 (zgodnie z rokiem publikacji, MEiN=100), a trzecia praca eksperymentalna w czasopiśmie „International Journal of Molecular Sciences” o IF=5,6 (zgodnie z rokiem publikacji, MEiN=140). Łączny IF trzech publikacji wchodzących w skład kompilacji wynosi 18,19, a łączna liczba punktów MEiN – 380.

Rozprawę doktorską rozpoczyna Streszczenie w języku polskim i angielskim. Siedmiostronicowy Wstęp zawiera opis działania insuliny, procesu insulinooporności u człowieka, EMS, ochwatu i potencjalnego zaangażowania komórek macierzystych oraz niekodujących fragmentów RNA w terapii EMS.

Wyodrębniono dwa cele rozprawy doktorskiej:

1. selekcja kandydatów do wczesnej diagnostyki insulinooporności wątrobowej spośród niekodujących fragmentów RNA (miRNA oraz lncRNA),
2. opracowanie protokołu izolacji oraz charakterystyka HPC, ze względu na ich udział w patofizjologii ochwatu oraz potencjał terapeutyczny.

Doktorantka sformułowała dwie hipotezy badawcze, według których:

1. miRNA oraz lncRNA mogą być wykorzystane jako markery we wczesnej diagnostyce insulinooporności wątrobowej,
2. komórki macierzyste korony rogotwórczej kopyta biorą udział w patofizjologii ochwatu, a analiza sekretomu miRNA HPC w warunkach fizjologicznych i podczas indukowanego procesu zapalnego stanie się podstawą do opracowania diagnostyki oraz terapii ochwatu.

W następnej kolejności zostały zamieszczone Komentarze do publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej. Trzy spośród czterech publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej zostały już opublikowane, a przed przyjęciem ich do publikacji zrecenzowane, zatem ponowna ich recenzja przeze mnie nie ma uzasadnienia. Natomiast czwarty komentarz dotyczy części badań porównawczych mezenchymalnych komórek HPC i ASC w warunkach eksperymentalnie indukowanej hiperinsulinemii (badania nieopublikowane). Wykazano, że HPC i ASC wykazują podobną dynamikę oraz odpowiedź w warunkach hiperinsulinemii, jednak komórki HPC charakteryzuje inny poziom ekspresji wybranych miRNA, co predysponuje HPC do wykorzystania w terapii ochwatu.

Dyskusja zajęła 4 strony. Doktorantka wyodrębniła trzy fragmenty miRNA: mir-802, mir-122 oraz mir-499 oraz trzy fragmenty lncRNA: MALAT1, MEG3 oraz H19 jako potencjalnych markerów insulinooporności. Omówiła następnie potencjał wyizolowanych i scharakteryzowanych komórek HPC do terapii ochwatu i porównała te komórki z komórkami ASC. Zaznaczyła, że wyniki Jej badań wykazały, że HPC posiadają podobną morfologię

do komórek ASC, ale niższy potencjał proliferacyjny oraz migracyjny, co sugeruje, że aktywność HPC może być ograniczona tkankowo. Ponadto HPC wykazywały niższą ekspresję metaloproteinaz w warunkach fizjologicznych, co predysponuje je do użycia w terapii ochwatu.

Na podstawie wyników osiągniętych w pracy doktorskiej sformułowano dziewięć wniosków. W Spisie literatury zawarto 130 pozycji.

Ocena rozprawy doktorskiej

Całość przedstawionych wyników ujętych jako kompilacja trzech publikacji uważam za oryginalne osiągnięcie badawcze, które spełnia wymogi stawiane pracom doktorskim.

Do szczególnych osiągnięć ocenianej rozprawy doktorskiej zaliczam:

1. Wyodrębnienie na podstawie dostępnej literatury niekodujących RNA: miR-802, miR-499, miR-122, lncRNA MALAT1, lncRNA MEG3, lncRNA H19 jako potencjalnych markerów insulinooporności wątrobowej oraz schorzeń metabolicznych.
2. Wyizolowanie oraz scharakteryzowanie HPC w kierunku opracowania terapii ochwatu.
3. Porównanie morfologii, potencjału proliferacyjnego i migracyjnego ASC i HPC w warunkach fizjologicznych i eksperymentalnie indukowanego procesu zapalnego oraz wykazanie:
 - niższego potencjału proliferacyjnego i migracyjnego ASC,
 - niższego poziomu ekspresji metaloproteinaz oraz wyższego poziomu ekspresji VEGFA HPC,
 - większej odporności na stres oksydacyjny oraz wyższego poziomu dynamiki mitochondrialnej HPC,
 - różnej dynamiki mitochondrialnej podczas procesu zapalnego dla badanych komórek mezenchymalnych,
 - zaangażowania określonych miRNA (miR-21-5p, miR-27a, miR-30c-5p, miR-34a-5p, miR34c, miR-96-5p, miR-125a, miR-125b-5p, miR-218, miR-451) w HPC podczas procesu zapalnego i wskazanie ich potencjalnej roli w patofizjologii ochwatu, a także potencjału diagnostycznego oraz terapeutycznego.

Komentarz, pytania i uwagi

1. Rozprawa doktorska jest wyrazem zaangażowania Doktorantki na każdym etapie jej powstania ponieważ wykazała się Ona dociekliwością naukową w postaci wnikliwego przeprowadzenia przeglądu literatury, jaki wykorzystwała w pierwszej pracy wchodzącej w skład rozprawy (DOI:10.3390/ijms21114182), ale również podczas opracowania dysertacji. Jej bogaty i prawidłowo dobrany warsztat metodyczny użyty przy wykonywaniu doświadczeń na komórkach macierzystych świadczy o znajomości praktycznej pracy laboratoryjnej. Wyniki badań eksperymentalnych zostały opublikowane w dwóch kolejnych, bardzo cenionych czasopismach, co z kolei świadczy o wysokim poziomie uzyskanych wyników i bardzo dobrym przygotowaniu Doktorantki do opracowania wyników oraz doprowadzenia ich do finalnej wersji artykułów (DOI:10.1007/s12015-021-10187-x, DOI:10.3390/ijms241411446). Mimo, że ostatnia część badań nie została jeszcze opublikowana, to praca doktorska jest spójna, a trzy publikacje jakie weszły w jej skład są wystarczające do ubiegania się o stopień doktora.
2. Tytuł pracy doktorskiej powinien zostać doprecyzowany ponieważ nie zawiera się w nim znaczna część wykonanych badań mających na celu opracowanie protokołu izolacji oraz charakterystykę komórek progenitorowych korony rogotwórczej kopyta, ze względu na ich udział w patofizjologii ochwatu oraz potencjał terapeutyczny.
Chociaż pierwsza publikacja przeglądowa nie dotyczyła stricte selekcji niekodujących fragmentów RNA jako kandydatów do wczesnej diagnostyki insulinooporności u konia, to w dalszej części rozprawy doktorskiej zarówno część doświadczalna, metodyczna i wnioskowanie dotyczy schorzenia diagnozowanego u konia. Zatem w tytule rozprawy doktorskiej powinna widnieć nazwa gatunku.
3. Niekompletny tytuł rozprawy w dalszej części rozprawy wiąże się z tym, że został sformułowany cel główny i cel dodatkowy. W mojej opinii ten cel dodatkowy jest jednak wiodący, skoro ostatecznym zwieńczeniem jego realizacji są dwie spośród trzech publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej. Zatem w dysertacji powinny być postawione dwa główne, równorzędne cele badawcze i dwie główne hipotezy badawcze.
4. Istnieją dane literaturowe dotyczące ekspresji miRNA u koni z ochwatem, jednak w pierwszej publikacji Doktorantka pominęła przegląd literatury dotyczący tego gatunku, a skupiła się na insulinooporności u człowieka. Oczekiwałabym poszerzenia wiedzy z badanego zakresu, np. o omówienie wyników pracy Lecchi i in. 2018. (Animal.;12:366-375, doi: 10.1017/S1751731117001525) podczas obrony pracy doktorskiej.

5. Rozdział Dyskusja nie został podzielony na podrozdziały, a wg mnie taki podział ułatwiłby prowadzenie dyskusji osiągniętych wyników z dostępną literaturą oraz sprawiłby, że tekst jest bardziej przejrzysty dla odbiorcy, np. Doktorantka przechodzi z omówienia tematyki dotyczącej komórek macierzystych do niekodujących fragmentów RNA bez zaznaczenia tego jako kolejnego podrozdziału czy nawet bez wydzielenia kolejnego akapitu.
6. Proszę o wyjaśnienie dlaczego nie ma konsekwencji w rozprawie doktorskiej jeśli chodzi o wybór niekodujących RNA potencjalnie zaangażowanych w insulinooporność. Dlaczego Doktorantka nie wzięła pod uwagę fragmentów RNA jakie wybrała w pierwszej publikacji do badań w IV ostatniej publikacji (badania nieopublikowane do czasu wykonania recenzji)?
7. Wnioski sformułowane zostały nieczytelnie. Proponuję ich przeredagowanie i uporządkowanie ze zwróceniem uwagi na najważniejsze osiągnięcia wynikające z uzyskanych badań oraz przedstawienie ich podczas obrony pracy doktorskiej.
Wątpliwości budzi sformułowanie oczekiwań co do HPC we wniosku nr 4. Ten typ komórek ma potencjał do wdrożenia w terapii ochwatu mimo „niższego potencjału proliferacyjnego oraz migracyjnego”. Komórki APC mogą być wykorzystane w innych schorzeniach, być może w szerszym kontekście, natomiast tzw. celowana terapia z użyciem HPC, może ostatecznie mieć więcej zalet i być efektywniejsza.
Wnioski nr 4 i 9 w obecnym brzmieniu mają sprzeczny wydźwięk, czy można je sformułować bardziej precyzyjnie?
8. Nie mam uwag dotyczących merytorycznego opracowania rozprawy doktorskiej. Natomiast z recenzenckiego obowiązku zwracam uwagę, że Autorka nie ustrzegła się od niedociągnięć językowych, do których należą głównie błędy literowe, interpunkcyjne i drobne błędy stylistyczne, ale nie umniejszają one wartości merytorycznej pracy.
9. Wyniki badań jakie Doktorantka zebrała jako czwarta publikacja, wysłana do IJMS (*Pielok Ariadna, Króliczewski Jarosław, Kępska Martyna, Marycz Krzysztof: A comparative Study of Equine Hoof Progenitor Cells and Adipose-Derived Stem Cells in Hyperinsulinemia*), są w mojej opinii clou całej rozprawy doktorskiej i jestem bardzo ciekawa czy na etapie obrony pracy publikacja została przyjęta do publikacji oraz na jakim etapie obecnie znajduje się, proszę o informację podczas obrony pracy doktorskiej.

Podsumowanie i wniosek końcowy

Przedstawione w niniejszej recenzji uwagi i komentarze stanowią element naukowego dyskursu i nie umniejszają wartości merytorycznej dysertacji. Praca napisana jest poprawnie, wyniki zostały opublikowane w trzech publikacjach o wysokim IF. Niekodujące fragmenty RNA, jak i HPC mogą posłużyć odpowiednio jako narzędzie diagnostyczne oraz terapeutyczne w insulinooporności oraz do opracowania terapii ochwatu, a dalsze badania nad poznaniem ich funkcji będą podstawą wartościowych publikacji.

W mojej opinii, rozprawa doktorska lek. wet. Ariadny Pielok stanowi poprawne, interesujące, cenne naukowo i wdrożeniowo rozwiązanie problemu naukowego. Wyniki badań zostały już częściowo opublikowane, co świadczy nie tylko o ich wysokiej jakości, ale również o prężności i naukowym zacięciu Doktorantki. W związku z tym stwierdzam, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska pt. „*Małe niekodujące RNA jako potencjalne narzędzie diagnostyczne oraz terapeutyczne w insulinooporności*” spełnia warunki określone w art.187 ust. 1-4 z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2023, poz. 742 ze zm.).

W związku z powyższym przedkładam wniosek o dopuszczenie Pani lek. wet. Ariadny Pielok do dalszych etapów przewidzianych postępowaniem o ubieganie się o stopień doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne.



KIEROWNIK ZAKŁADU
OCHRONY BIORÓŻNORODNOŚCI

prof. dr hab. inż. Anna Korzekwa
IRZiBŻ PAN w Olsztynie