



UNIwersytet WarMińsko-Mazurski w Olsztynie

WYDZIAŁ NAUK MEDYCZNYCH

Katedra Neurologii i Neurochirurgii

Laboratorium Badań nad Komórkami Macierzystymi

Centrum Innowacyjnych Technik Diagnostycznych i Terapeutycznych

Pracownia Medycyny Regeneracyjnej

10-082 Olsztyn, Al. Warszawska 30, Tel. 89 524 53 38

e-mail: stemcells.laboratory@uwm.edu.pl

Olsztyn, dnia 28 grudnia 2016r.

Recenzja osiągnięcia naukowego „Charakterystyka molekularna oraz modyfikacja genetyczna mięśniowych komórek macierzystych w odniesieniu do ich przydatności w terapii regeneracyjnej” w postępowaniu habilitacyjnym w dziedzinie nauk medycznych, w dyscyplinie biologia medyczna, doktor Natalii Rozwadowskiej

wraz z

Opinią na temat osiągnięć naukowo-badawczych oraz dorobku dydaktycznego i popularyzatorskiego dr Natalii Rozwadowskiej w związku z prowadzonym postępowaniem habilitacyjnym w dziedzinie nauk medycznych, w dyscyplinie biologia medyczna.

Dr Natalia Rozwadowska w 2000 roku ukończyła studia na kierunku biotechnologia Uniwersytetu Przyrodniczego im. Augusta Cieszkowskiego w Poznaniu. W 2005 roku uzyskała stopień naukowy doktora nauk biologicznych na Wydziale Lekarskim Akademii Medycznej im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu. Rozprawa doktorska, której promotorem był prof. dr hab. Maciej Kurpisz, miała tytuł: "Analiza molekularna genów systemu interleukiny 1 w gonadzie męskiej". Od 1998 roku do chwili obecnej dr Rozwadowska pracuje w Instytucie Gentyki Człowieka Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu, ostatnio na stanowisku asystenta. W latach 2013-2015 przebywała na postdoktoranckim stażu naukowym w Stem Cell Institute University of Birmingham w Stanach Zjednoczonych.

Osiągnięcia naukowe

Osiągnięciem naukowym, które stanowi wypełnienie wymogu określonego w art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003r. o stopniach naukowych i tytule naukowym jest cykl siedmiu prac o zbiorczym tytule **„Charakterystyka molekularna oraz modyfikacja genetyczna mięśniowych komórek macierzystych w odniesieniu do ich przydatności w terapii regeneracyjnej”**

Wszystkie prace tego cyklu zostały opublikowane w czasopismach indeksowanych (5 prac) lub jako rozdziały do książek (2 prace), w latach 2012-2016. Łączna ocena bibliometryczna wskazuje na wysokie znaczenie tych publikacji: łączny IF 15,588. Autorka określiła cel swoich badań jako: **„Uzyskanie populacji macierzystych komórek mięśni szkieletowych optymalnej dla celów regeneracji narządów z uwzględnieniem uszkodzonego serca po zawale i mięśni zwieraczy odbytu”**. Badania dotyczyły głównie określenia właściwości komórek macierzystych mięśni szkieletowych zarówno w warunkach "in vitro" jak i "in vivo" na modelu mysim. Ważnym elementem badań było także stworzenie podstaw do klinicznego wykorzystania tych badań u chorych z niedokrwinnym uszkodzeniem mięśnia serca i zwieracza odbytu. Realizacja celu badań nastąpiła w wyniku prowadzenia prac z zakresu badań podstawowych, przedklinicznych i klinicznych. W pierwszym etapie dr Rozwadowska, wraz z zespołem współpracowników skupiła się na optymalizacji izolacji i hodowli mioblastów. W efekcie powstał rutynowo stosowany panel jakościowej oceny uzyskiwanych populacji mioblastów ludzkich składający się z: cytometrycznej analizy obecności antygenu CD56, immunocytofluorescencyjnej oceny obecności desminy (DES) jako markera komórek miogennych i MYH2, jako markera obecności komórek na dalszym etapie różnicowania oraz oceny poziomu ekspresji czynników transkrypcyjnych z zakresu miogennych czynników regulatorowych (MRF), przy użyciu metody PCR w czasie rzeczywistym. W pracy "In vitro culture of primary human myoblasts by using the dextran microcarriers Cytodex3" opublikowanej w 2016 r. w *Folia Histochemica et Cytobiologica* autorka podsumowała wyniki badań dotyczących próby wykorzystania nośników dextranowych Cytodex3, w celu ograniczenia zarówno powierzchni jak i ilości mediów hodowlanych stosowanych przy hodowlach prowadzonych na wielką skalę, pod kątem ich wykorzystania do ewentualnych zastosowań klinicznych. Badania te wykazały większą przydatność hodowli na podłożach tradycyjnych.

Jako kierownik projektu badawczego „Pozycjonowanie chromosomów w różnicujących się komórkach macierzystych pochodzenia mięśniowego” prowadziła badania, w których wyniku których stwierdzono, że w trakcie procesu miogenezy prowadzonego „in vitro” więcej genów ulegało wyciszeniu niż zostało aktywowanych, co było skorelowane z przemieszczaniem się centromerów wybranych chromosomów w okolice peryferii jądra komórkowego. Wyniki zostały przedstawione w pracy “Characterisation of nuclear architectural alterations during in vitro differentiation of human stem cells of myogenic origin” opublikowanej w 2013r. w piśmie PLoS One.

Kolejne prace dotyczyły oceny wpływu komórek macierzystych na proces naprawczy po wywołaniu zawału serca w modelu zwierzęcym. Stwierdzono, że poziom osoczonego markera prognostycznego niewydolności serca – NT-pro-BNP ponad trzykrotnie podwyższył się po 21 dniach od mikrochirurgicznej indukcji zawału u myszy, podczas gdy transplantacja komórek obniżała jego poziom do zakresu stwierdzanego u zdrowych zwierząt. Ponadto stwierdzono w takich sytuacjach niższą ekspresję genów Nppa (Natriuretic Peptide A), Ctgf (Connective Tissue Growth Factor), Gata4 (GATA Binding Protein4) u myszy poddanych terapii komórkowej po zawale serca. Może to być związane z aktywowanym przez komórki macierzyste ograniczeniem patologicznej przebudowy mięśnia serca po jego zawale. Autorka wykazała, że potencjalne korzystne oddziaływanie terapeutyczne pozawałowego podania komórek macierzystych może być też związane z korzystnym wpływem na obniżenie współczynnika ekspresji Pbl/Serca2a, co może oddziaływać na poprawę czynności skurczowej serca. Wyniki tych badań podsumowano w pracy: "Human myoblast transplantation in mice infarcted heart alters the expression profile of cardiac genes associated with left ventricle remodeling" opublikowanej w 2015 r. w piśmie International Journal of Cardiology.

Dalsze badania były prowadzone nad pozyskaniem korzystnych cech mioblastów na drodze modyfikacji genetycznej. Poprzedziła je analiza możliwości zastosowania modyfikacji genetycznej komórek macierzystych ze szczególnym uwzględnieniem terapii genowej „ex vivo” przedstawiona w rozdziale książki „Advances in Genetic Research” opublikowanej przez NOVA Science Publishers w 2012 roku. Wykorzystując techniki inżynierii genetycznej dr Rozwadowska przeprowadziła serię badań, w których wyniku wykazała, że uzyskana linia mioblastów mysich charakteryzowała się 7-9-krotną nadekspresją mRNA dla koneksyny 43. Uzyskanie koneksyny 43 nie zmieniło mioblastów C2C12w warunkach standardowych, natomiast w warunkach stresu oksydacyjnego nadekspresja GJA1 wykazuje właściwości cytoprotekcyjne, w wyniku czego liczba żywych komórek zwiększyła się z 68 do 80%. Wyniki tych badań zostały opublikowane w 2012 roku jako rozdział w książce „New Frontiers in Heart Disease” pod redakcją Asher Kimchi, przez wydawcę MEDIMOND.

Po przeprowadzeniu wstępnych badań na ustalonej linii komórkowej, badaczka przeszła do pracy na mioblastach ludzkich. W kolejnych doświadczeniach populacje mioblastów wykazujących wymuszoną ekspresję GJA1 wykorzystano w badaniach przedklinicznych w modelu zmian pozawałowych mięśnia serca u myszy NOS-SCID. Przedstawiono, że zarówno zastosowanie mioblastów niemodyfikowanych jak i modyfikowanych genetycznie zatrzymuje pogarszanie się czynności serca po zawale, w porównaniu do grupy kontrolnej.

Obecność koneksyny-43 wpływała na przedłużenie czasu terapeutycznego oddziaływania zmodyfikowanych genetycznie mioblastów. Wyniki tych przedklinicznych badań zostały opublikowane w pracy : “In vitro and in vivo characteristics of connexin 43-modified human skeletal myoblasts as candidates for prospective stem cell therapy for the failing heart”, która ukazała się w 2014 roku w International Journal of Cardiology.

Cykl prac przedstawionych do oceny zamyka prezentacja wyników klinicznego zastosowania autologicznych ludzkich mioblastów w terapii uszkodzenia zwieraczy odbytu. Jest to badanie fazy I i główny wniosek stanowi stwierdzenie, że procedura jest bezpieczna dla pacjentów. Ponadto w połowie przypadków zaobserwowano regenerację mięśni. Mimo, że materiał dotyczył tylko 10 chorych, praca ma duże znaczenie otwierając drogę do dalszych prób leczenia komórkowego chorych z nietrzymaniem stolca z przyczyn nie związanych z uszkodzeniem unerwienia zwieracza. Wyniki badań prowadzonych wspólnie z klinicystami z Kliniki Chirurgii Ogólnej Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie były opublikowane w 2015 roku w piśmie „Techniques in Coloproctology”, pod tytułem „Implantation of autologous muscle-derived stem cells in treatment of fecal incontinence: results of an experimental pilot study”.

Cykl przedstawionych do oceny prac, które powyżej omówiłem, w pełni odpowiada zapisom art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym stanowiąc znaczny wkład autora w rozwój nauk medycznych, w szczególności w zakresie biologii medycznej.

Pozostałe osiągnięcia naukowe.

Dr Rozwadowska poza siedmioma pracami stanowiącymi omówiony wyżej cykl publikacji, jest autorem lub współautorem 29 prac zarejestrowanych w bazie Journal Citation Reports (JCR). Pierwsza publikacja i rozprawa doktorska dotyczyły badań z zakresu biologii molekularnej i genetycznego podłoża zaburzeń spermatogenezy u człowieka. Tematyka ta powtarza się w kolejnych 9 publikacjach, aż do roku ubiegłego, należy więc uznać ją za ważny nurt pracy naukowej autorki. 11 opublikowanych prac dotyczy charakterystyki mioblastów, wpływu ich modyfikacji genetycznej na produkcję czynników wzrostowych i paraendokrynnych, hodowli komórkowej i jej wykorzystania dla transplantacji do serca. Zwraca uwagę udział w przygotowaniu materiału komórkowego dla śmiałych prób implantacji podejmowanych przez kardiologów u chorych z różnego rodzaju poważnymi chorobami serca, które w połowie pierwszej dekady XXI wieku były pionierskie w Polsce i na

świecie. Cenne jest, że mimo nie upowszechnienia się tych metod w rutynowej praktyce klinicznej, dr Rozwadowska, wraz z całym zespołem Instytutu Genetyki Człowieka PAN nie zaniechała dalszych prac nad podstawami terapii komórkowej uszkodzeń mięśnia serca, a wręcz je pogłębiła, co stało się głównym przedmiotem cyklu prac badawczych dowodzących znacznego dorobku naukowego uzasadniającego staranie o stopień naukowy doktora habilitowanego. Inne 2 prace dotyczą charakterystyki telomerów jako czynnika o potencjalnym znaczeniu diagnostycznym w onkologii (rak piersi) i poznawczym w zakresie opisu zmian obserwowanych w zespole Downa. Autorka posłużyła się tu metodą Southerna dla analizy długości telomerów. W ostatnim czasie uczestniczyła też w badaniach nad metodyką uzyskiwania indukowanych komórek pluripotencjalnych, między innymi dla próby eksperymentalnej terapii choroby neurodegeneracyjnej – ataksji Friedreicha.

Niewątpliwymi osiągnięciami naukowymi było też autorstwo lub współautorstwo 12 monografii, udział w 17 międzynarodowych i polskich projektach badawczych, 22-krotne wygłoszenie referatów na konferencjach naukowych, 40 ustnych doniesień i 60 plakatowych na konferencjach naukowych.

Ilość i znaczenie międzynarodowych i krajowych nagród za działalność naukową, które uzyskała Habilitantka są imponujące. Najważniejsze z nich to:

- Nagroda Prezesa Rady Ministrów za wyróżnioną rozprawę doktorską (2007r.),
- Zespołowa Nagroda Naukowa Ministra Zdrowia za cykl 5 prac (2007),
- Amerykańska „Lalor Foundation Ravel Award” dla młodych naukowców przed doktoratem.

Kolejne kryteria oceny w zakresie osiągnięć naukowo-badawczych habilitantki, w pełni wypełniają wymogi określone dla habilitacji w przepisach o stopniach naukowych:

- Wysoki sumaryczny impact factor według listy Journal Citation Reports (JCR), zgodnie z rokiem opublikowania, wynoszący **83,285**,
- Liczba cytowań publikacji według bazy Web of Science (WoS): **572**,
- Indeks Hirscha według bazy Web of Science (WoS): **9**.

Dorobek dydaktyczny i popularyzatorski

Mimo pracy w instytucie o charakterze badawczym, co ogranicza możliwość systematycznej pracy dydaktycznej w zakresie wymaganym od nauczyciela akademickiego, Habilitantka w latach 2006-2012 prowadziła zajęcia ze studentami II i III roku kierunku biotechnologia Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu. Były to ćwiczenia i wykłady fakultatywne na temat: „Inżynieria i terapia komórkowa”.

Ważnym zadaniem, które należy zakwalifikować do dydaktyki jest nadzór naukowy nad 13 studentami i młodymi lekarzami w trakcie specjalizacji, a także dwukrotne pełnienie funkcji promotora pomocniczego w przewodach doktorskich oraz opieka naukowa nad trzema doktorantami.

Ponadto od 2016 roku zajmuje się popularyzacją nauki jako Koordynator ds. Popularyzacji Nauki w Instytucie Genetyki Człowieka PAN. Interesującym i unikalnym zadaniem jest popularyzowanie nauki wśród najmłodszych, czym dr Rozwadowska zajmuje się od 2008 roku do chwili obecnej. Ta trudna do przecenienia praca polega na opracowaniu programu oraz prowadzeniu warsztatów dot. genetyki człowieka i biologii komórek dla dzieci przedszkolnych i wczesnoszkolnych.

Członkostwo w międzynarodowych i krajowych organizacjach oraz towarzystwach naukowych.

Habilitantka jest członkiem Towarzystwa Biologii Rozrodu (2015r. - Sekretarz Oddziału Poznańskiego) i Polskiego Towarzystwa Kardiologicznego (2014)

Po dokonaniu powyższej oceny osiągnięć naukowo-badawczych, dorobku dydaktycznego i popularyzatorskiego z uwzględnieniem współpracy międzynarodowej i nagród Habilitantki, nie mam żadnych wątpliwości, że dr Natalia Rozwadowska w sposób wzorcowy wypełniła wszystkie wymagane prawem kryteria dla uzyskania stopnia naukowego doktora habilitowanego w dziedzinie nauk medycznych, w dyscyplinie biologia medyczna.

Prof. dr hab. n. med. Wojciech Maksymowicz

