



Gdańsk, 20 grudnia 2023

Prof. dr hab. med. Ryszard Słomski
Przewodniczący Komisji Doktorskiej
Instytut Genetyki Człowieka
Polskiej Akademii Nauk
ul. Strzeszyńska 32, 60-479 Poznań

Recenzja pracy doktorskiej mgr Inż. Magdaleny Nowaczyk pt. „Cytoprotekcyjna rola antyoksydantów (SOD3 i PBN) wobec ludzkiej komórki mięśniowej rezerwuaru tkankowego”.

Praca doktorska mgr inż. Magdaleny Nowaczyk ma charakter zbioru publikacji zawierającej: wykaz publikacji stanowiących podstawę pracy doktorskiej, spis treści, wstęp, cel rozprawy, bibliografię, opisy publikacji wchodzących w skład pracy doktorskiej, podsumowanie wyników, streszczenia w języku polskim i angielskim. Publikacje stanowiące podstawę pracy doktorskiej to prace oryginalne opublikowane w bardzo dobrych czasopismach i we wszystkich Doktorantka jest pierwszym autorem. Z deklaracji doktorantki i współautorów wynika jednoznacznie wiodąca rola Doktorantki we wszystkich aspektach powstawania tych publikacji. Praca doktorska liczy łącznie 118 stron. Jest przygotowana bardzo starannie i w klarowny sposób przedstawia wszystkie aspekty kluczowe dla jej oceny.

Głównym wyzwaniem klinicznym do którego nawiązują badania prowadzone w ramach doktoratu jest leczenie pozawałowego uszkodzenia mięśnia sercowego. Patologia ta jest związana z utratą znaczącej części funkcjonalnych komórek odpowiedzialnych za pracę mechaniczną serca. Jest to kompensowane przerostem pozostałych komórek, co jedynie częściowo pomaga w utrzymaniu funkcji, a w efekcie prowadzi do postępującej niewydolności tego narządu. Możliwości samoistnej naprawy przez odtworzenie puli komórkowej serca są bardzo ograniczone u człowieka, w przeciwieństwie do niektórych zwierząt. Wielkie nadzieje budzi terapeutyczne zastosowanie komórek macierzystych jako czynnika wspierającego endogenne



mechanizmy naprawcze w sercu, jednak zastosowanie takiej terapii wymaga dogłębnego zrozumienia mechanizmów i opracowania odpowiednich procedur takich jak optymalne źródło takich komórek, przygotowanie w tym modyfikacje genetyczne, odpowiednia propagacja oraz wprowadzenie do struktury narządu. W każdym z tych aspektów istnieją wyzwania i prowadzone są intensywne badania.

Celem przedstawionej mi do oceny pracy było uzyskanie zoptymalizowanego protokołu hodowli *in vitro* komórek macierzystych/progenitorowych pochodzących z mięśni szkieletowych (SkMDS/PCs) w celu ich potencjalnego wykorzystania w regeneracji serca po zawale. W szczególności chodziło o poprawę efektywności hodowli tych komórek *in vitro* oraz o uzyskanie optymalnych właściwości cytoprotekcyjnych oraz proregeneracyjnych.

Badania obejmowały modyfikacje ludzkich komórek SkMDS/PCs poprzez hodowlę w warunkach standardowych i hipoksji, nadekspresję genu SOD3; kondycjonowanie hodowli egzogennym antyoksydantem PBN oraz inhibicję mikroRNA-195. Określono wpływ tych modyfikacji na wystąpienie markera CD56, zdolność do formowania miotub, poziom apoptozy, odsetek komórek młodych, starzejących się i starych. Oceniono także poziom ekspresji genów/białek antyoksydacyjnych i przeciwstarzeniowych. Ponadto, oceniono wpływ PBN na utrzymanie długości telomerów.

Głównym wnioskiem pracy jest wykazanie, że komórki macierzyste pochodzące z rezerwuaru mięśni szkieletowych z nadekspresją SOD3 oraz prekondycjonowane PBN, hodowane *in vitro* w warunkach hipoksji posiadały lepszy potencjał w stosunku do komórek natywnych. Ponadto komórki wykazywały adaptację do warunków stresu tlenowego. Doktorantka sugeruje, że zastosowanie wzajemnie uzupełniających się modyfikacji: nadekspresji SOD3 i kondycjonowania PBN może być obiecującą strategią optymalizacji protokołu przygotowania komórek do zastosowania w terapiach regeneracyjnych.

Wyniki realizacji poszczególnych zadań pozwoliły na przyjęcie następujących wniosków:



Warunki hipoksji w hodowli *in vitro* odpowiadające warunkom panującym w sercu pozawałowym mogą być z powodzeniem stosowane jako czynnik modyfikujący i adaptujący ludzkie komórki macierzyste pochodzenia mięśniowego *in vitro* do terapii narządowej.

Nadekspresja genu SOD3 w komórkach macierzystych/progenitorowych pochodzenia mięśniowego poprawia ich właściwości biologiczne poprzez polepszenie ich zdolności do formowania miotub i obniżenie poziomu apoptozy.

Komórki pre-kondycjonowane egzogennym antyoksydantem PBN utrzymują swój fenotyp i zachowują poziom ekspresji genów antyoksydacyjnych w warunkach hipoksji. Uzyskane efekty pre-kondycjonowania związkami PBN obejmują: wysoki odsetek młodych komórek, niski odsetek apoptozy, utrzymaną długość telomerów oraz poziom proliferacji populacji komórkowej *in vitro*. Na ich podstawie można wnioskować, iż poddane działaniu PBN, ludzkie SkMDS/PCs lepiej adaptują się do warunków hipoksji, dzięki czemu mogą być łatwiej namnażane dla prospektywnej terapii komórkowej utrzymując swoją charakterystykę.

Inhibitor miR-195 może służyć jako czynnik pre-kondycjonujący, poprawiający potencjał proliferacyjny SkMDS/PCs i zwiększający ekspresję genu antyoksydacyjnego SOD3, ale niewpływający na starzenie się komórek i poziom apoptozy.

Ze względu na publikację tych wyników w bardzo dobrych czasopismach ich jakość została poddana wnikliwej ocenie w redakcji czasopism. Ze swej strony chciałbym podkreślić wysoki stopień trudności prowadzonych badań. Obejmowały one izolację komórek z materiału klinicznego i ich inkubację w warunkach zróżnicowanego stężenia tlenu, transfekcję komórek z zastosowaniem elektroporacji lub lipofekcji, przygotowanie plazmidów do transfekcji, cytometrię przepływową, ocenę tworzenia myotub, starzenia komórek, apoptozy, tworzenia wolnych rodników, długości telomerów oraz



analizę ekspresji genów z zastosowaniem real-time PCR oraz zawartości białek z zastosowaniem Western Blot.

Bardzo interesująca jest lektura wstępu obejmująca zarówno naświetlenie problemu klinicznego, czyli zawału mięśnia sercowego oraz aktualnie badanych terapii biologicznych w tej patologii. Kolejna część obejmuje wprowadzenie do tematyki komórek macierzystych oraz ich zastosowania w terapiach komórkowych w kardiologii. Dalsze części omawiają modyfikacje komórek macierzystych dla celów terapii kardiologicznych oraz sposoby ich podawania. W końcowej części przedstawiono racjonalne przesłanki do zbadania modyfikacji testowanych w pracy doktorskiej.

Przy tak obszernym zakresie wstępu trudno jest oczekiwać kompletnego przedstawienia wszystkich problemów jednak wybór najważniejszych i najbardziej aktualnych należy uznać za właściwy. Brakuje jedynie podsumowania przeprowadzonych i aktualnie prowadzonych badań klinicznych nad zastosowaniem komórek macierzystych w regeneracji serca po zawałe. Chętnie też wysłuchałbym opinii Doktorantki na temat perspektyw szerokiego zastosowania takiej terapii w przyszłości, jej ograniczeń i możliwości.

Praca doktorska mgr Magdaleny Nowaczyk stanowi znaczący wkład w rozwój terapii komórkowych w leczeniu pozawałowego uszkodzenia mięśnia sercowego. Oceniana praca spełnia wszystkie kryteria stawiane rozprawie doktorskiej określone w aktualnie obowiązujących regulacjach prawnych. Wnoszę do Rady Naukowej Narodowego Instytutu Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie, Państwowego Instytutu Badawczego o dopuszczenie mgr Magdaleny Nowaczyk do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ponadto biorąc pod uwagę znaczenie praktyczne uzyskanych wyników, stopień złożoności prowadzonych badań i ich publikacje w bardzo dobrych czasopiśmie wnoszę o przyznanie nagrody.

KIEROWNIK
z poważaniem
Katedra Biochemii
Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego
Ryszard Tomasz Smoleński
prof. dr hab. *Ryszard Tomasz Smoleński*