Prof. dr hab. Maria Jolanta Rędowicz
Kierownik Pracowni Molekularnych
Podstaw Ruchów Komórkowych

Warszawa, 6 listopada 2019 r.

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Marii Sikorskiej pt.:
"Wpływ β-escyny na regenerację mięśni szkieletowych"
wykonanej w Zakładzie Immunologii, Biochemii i Żywienia Wydziału Nauk o Zdrowiu
Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego pod kierunkiem
prof. dr hab. Katarzyny Koziak

Rozprawa doktorska mgr Marii Sikorskiej dotyczy istotnego zarówno z biologicznego, jak i praktycznego punktu widzenia problemu regeneracji uszkodzonych mięśni szkieletowych. Doktorantka w swoich badaniach skupiła się na poznaniu wpływu β-escyny na ich regenerację. β-escyna to związek pochodzenia naturalnego o szerokim zastosowaniu w medycynie, znany głównie z działania przeciwobrzękowego i przeciwwysiękowego, co wynika z jego ochronnego wpływu na naczynia krwionośne. Badania prowadzone w zespole kierowanym przez prof. Katarzynę Koziak wykazały, że w komórkach śródbłonka naczyń krwionośnych β-escyna stymuluje syntezę cholesterolu oraz obniża odpowiedź tych komórek na działanie cytokiny prozapalnej - czynnika martwicy nowotworów TNFα, m.in. poprzez hamowanie aktywności czynnika transkrypcyjnego NFκB i zdolności migracyjnej tych komórek. Badanie te wskazały również na możliwość zastosowania β-escyny nie tylko w układzie naczyniowym. Jednym z takich potencjalnych zastosowań są właśnie mięśnie szkieletowe, regeneracja których to bardzo złożony proces i wciąż nie do końca poznany.

Badania były finansowane przez Fundację na rzecz Nauki Polskiej oraz Unię Europejską z Europejskiego Funduszy Rozwoju Regionalnego, a także Grantu Młodego Naukowca przyznanego Doktorantce przez Warszawski Uniwersytet Medyczny.

Formalny opis rozprawy

Na rozprawę, przygotowaną w formie tradycyjnej monografii, składają się 93 stron maszynopisu, nie wliczając w to strony tytułowej, streszczeń w języku polskim i angielskim, podziękowań dla osób wspierających Doktorantkę podczas pracy nad doktoratem oraz informacje o finansowaniu jej badań. Rozprawa została przygotowana starannie, napisana poprawnym językiem polskim, jest bogato ilustrowana. Tekst dobrze się czyta, nie zauważyłam dużej liczby literówek i błędów gramatycznych, acz pewne niefortunne sformułowania się znalazły jak np. spadek ATP zamiast spadek (obniżenie) poziomu ATP, a także cytoszkielet komórkowy. W rozprawie nie ponumerowano poszczególnych części rozprawy, co utrudnia lekturę tekstu, a zwłaszcza sięganie po informacje

Pracownia Molekularnych Podstaw Ruchów Komórkowych
Instytut Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego, Polska Akademia Nauk
ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa
tel.: (+48 22) 58 92 456, email: j.redowicz@nencki.gov.pl
www.nencki.gov.pl

zawarte w innych niż czytana w danym momencie część rozprawy.

Na część merytoryczną rozprawy składają się wspomniane wyżej streszczenia ze słowami kluczowymi, liczący 5 stron wykaz stosowanych w rozprawie skrótów i główne rozdziały rozprawy. Pierwszy z nich to 15. stronnicowy Wstęp, zawierający 3 ryciny (w tym wzór β-escyny) i 1 tabelę. W rozprawie nie wyróżniono tradycyjnego rozdziału cel i założenia pracy; te są zawarte w ostatnim akapicie Wstępu. Kolejny rozdział, Materiały i metody, liczy 13 stron, znajdują się w nim 3 ryciny i 3 tabele. Uzyskane wyniki są opisane na 35 stronach i zawierają 33 ryciny, często złożone. Dyskusja, liczy 9 stron, a po niej następuje jednostronnicowe Podsumowanie ze schematem przedstawiającym biologiczne aspekty uzyskanych przez Doktorantkę wyników. Na Bibliografię składa się 201 pozycji, przy czym ok. 20% z nich to artykuły opublikowane w okresie ostatnich pięciu lat, co niewątpliwie wskazuje na aktualność prowadzonych przez Doktorantkę badań.

Ocena merytoryczna

Streszczenia, przedstawione w formie bardzo zwięzłych abstraktów, to w zasadzie podsumowanie uzyskanych przez Doktorantkę wyników. **Wykaz skrótów** został przygotowany w językach polskim i angielskim, co uważam za duży plus. Bardzo zaniepokoił mnie jednak opis skrótów dla ciężkich łańcuchów miozyn konwencjonalnych (Myh); kłóci się on z obowiązującą od ponad dwóch dekad systematyką nadrodziny miozyn. Doktorantce polecam lekturę artykułu przeglądowego *Berg et al. (2001) A millennial myosin census. Mol. Biol. Cell 12(4):780-94* i liczę, że sprostuje ten rażący błąd podczas obrony rozprawy. Tu również zaznaczę, że nieprawidłowe nazwy ciężkich łańcuchów miozyny pojawiły się w dalszej części rozprawy. Zabrakło mi też wyjaśnienia, którą izoformę aktyny koduje gen *Acta1*.

Wstęp składa się z dwóch zasadniczych części. Pierwsza to opis właściwości β-escyny i jej zastosowania w medycynie, z elementami historycznymi. Szkoda, że Doktorantka nie przedstawiła mechanizmów działania tego związku w postaci schematu, ułatwiłoby to przyswojenie informacji. Druga część tego rozdziału to opis budowy i funkcjonowania mięśni szkieletowych ze szczególnym uwzględnieniem mechanizmów ich regeneracji. Mam wątpliwości, co do dwóch fragmentów tej części. Pierwsza to kwestia definicji tkanki łącznej - zajęcia z histologii miałam blisko cztery dekady temu, ale zapamiętałam, że tkanka tłuszczowa jest jednym z typów tkanki łącznej. Doktorantka traktuje je jako rozdzielne tkanki, czy coś zmieniło się w terminologii? Druga wątpliwość dotyczy zapisu na stronie 17, że kompleks DGC zapewnia stabilizację sarkolemmy podczas skurczu, czy na pewno tylko wtedy...

Tak jak już wcześniej wspomniałam, cel pracy został przedstawiony w ostatnim akapicie Wstępu. Doktorantka, w oparciu o wcześniej uzyskane w zespole prof. Koziak wyniki postawiła hipotezę, że β-escyna wpływa na poprawę regeneracji mięśni szkieletowych nie tylko pośrednio (poprzez poznany wcześniej wpływ na śródbłonek naczyń krwionośnych), ale i bezpośrednio na tkankę mięśniową. Jako model badawczy wybrała dobrze zdefiniowane anatomicznie i biochemicznie mięśnie kończyn tylnych szczura, które poddawała działaniu kardiotoksyny, co doprowadziło do

Pracownia Molekularnych Podstaw Ruchów Komórkowych
Instytut Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego, Polska Akademia Nauk
ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa
tel.: (+48 22) 58 92 456, email: j.redowicz@nencki.gov.pl
www.nencki.gov.pl

wybiórczego zniszczenia włókien mięśniowych, bez upośledzenia funkcji komórek satelitowych. Badała również wpływ β-escyny na różnicowanie mioblastów z mysiej linii C2C12 w warunkach indukcji stanu zapalnego.

Dla realizacji swoich zamierzeń Doktorantka wykorzystała szereg metod i technik badawczych, które opisała w rozdziale **Materiały i Metody**. Opisy są klarowne i w zasadzie wyczerpujące, Doktorantka często podawała szczegółowy protokół doświadczenia, a w przypadku analiz histologicznych posiłkowała się rycinami ułatwiającymi zrozumienie istoty analiz. Przedstawiła również przejrzysty schemat doświadczenia z wykorzystaniem zwierząt. Przy okazji, zastanawiam się dlaczego Doktorantka podawała β-escynę już na pięć dni przed uszkodzeniem mięśni i tylko trzy dni po uszkodzeniu. Z punktu widzenia potencjalnego pacjenta to trochę bezzasadne, bo przecież nie można przewidzieć, kiedy dojdzie do uszkodzenia mięśnia. Doktorantka wykorzystywała techniki biologii i biochemii komórki (np. hodowla mioblastów, analiza proliferacji komórek z wykorzystaniem testu BrDU, immunofluorescencja, analiza sekrecji/aktywności metaloproteinaz i dehydrogenazy aldehydowej oraz aktywacji szlaku NFκB), biologii molekularnej (ilościowy RT-qPCR) oraz histologiczne (analiza histochemiczna i immunohistochemiczna skrawków mięśni oraz zymografia *in situ*). Doktorantka podaje także sposób dokonywania analiz statystycznych, co ułatwia ocenę istotności statystycznej uzyskanych przez nią wyników. Jako olbrzymi plus uznaję podanie numeru zgody lokalnej komisji etycznej na pracę ze zwierzętami.

W rozdziale **Wyniki** Doktorantka opisuje uzyskane przez siebie dane, przedstawiając je na 33 rycinach. Ryciny są przygotowane w czytelny sposób, są opisane w stopniu umożliwiającym analizę przedstawianych na nich wyników. Wszystkie dane ilościowe poddane zostały analizie statystycznej. Zanim przejdę do oceny uzyskanych wyników pozwolę sobie na krytykę sposobu opisania wyników - opisy są bowiem bardzo lakoniczne, przy poszczególnych doświadczeniach Doktorantka nie przedstawiała ani uzasadnienia, dlaczego przeprowadzała dane doświadczenie, ani krótkiego podsumowania uzyskanych wyników. Takie wprowadzenie ułatwiłoby lekturę rozprawy. Przykładowo, domyśliłam się dlaczego w badaniu różnicowania mioblastów używano TNFα, a dopiero podczas lektury Dyskusji dowiedziałam się zasadności dokonywania pomiaru aktywności dehydrogenazy aldehydowej (ALDH). Ponadto, Doktorantka przyjęła taktykę przedstawiania najpierw wykresów z analiz cytochemicznych i histochemicznych, a dopiero potem prezentowała przykładowe obrazy. Wydaje mi się, że lepiej byłoby zastosować odwrotną kolejność.

Wyniki składają się z dwóch rozdzielnych części. W pierwszej Doktorantka opisuje wyniki uzyskane z wykorzystaniem mioblastów C2C12, a w drugiej - przeprowadzone na uszkodzonych kardiotoksyną mięśniach szybkich (EDL) i wolnych (soleus) kończyny tylnej szczura.

Hodowla mioblastów była w większości przypadków prowadzona w obecności stałego stężenia TNFα oraz wzrastających stężeń β-escyny. Nie rozumiem jednak, dlaczego część doświadczeń na mioblastach była przeprowadzana bez obecności tej cytokiny. Doktorantka wykazała, że w obecności TNFα β-escyna w stężeniach 5-20 μM powodowała niewielki wzrost proliferacji w stosunku do komórek kontrolnych (tych hodowanych jedynie w standardowej pożywce); hodowla w obecności wyższych stężeń β-escyny prowadziła do spadku potencjału proliferacyjnego, co zdaniem Doktorantki było spowodowane cytotoksycznością tego związku. Szkoda, że Doktorantka

Pracownia Molekularnych Podstaw Ruchów Komórkowych
Instytut Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego, Polska Akademia Nauk
ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa
tel.: (+48 22) 58 92 456, email: j.redowicz@nencki.gov.pl
www.nencki.gov.pl

nie pokusiła się o sprawdzenie cytotoksycznego efektu innymi powszechnie używanymi metodami (np. MTT). Analiza morfologii różnicujących mioblastów wykazała różnice począwszy od piątego dnia hodowli w pożywce różnicującej, gdy były obecne już miotuby, przy czym największe różnice były widoczne w dziewiątym dniu hodowli. W obecności samej β-escyny widoczne były liczne szerokie, owalne wielojądrzaste struktury z centralnie położonymi jądrami. Tych struktur nie było widać w hodowli z dodatkiem TNFα; *nota bene*, sama cytokina nie promowała tworzenia miotub.

Doktorantka wykazała również, że β-escyna w stężeniu 3 μM nie wpływała na poziom ekspresji czynników transkrypcyjnych *Pax3, Pax7* i miogeniny, a także *Acta1*, genu kodującego aktynę mięśni szkieletowych, *Myh2* i *Myh8* - kodujących odpowiednio ciężki łańcuch miozyny mięśniowej tzw. szybkiej (typ IIa) i okołoporodowej (perinatal) oraz *Ckm* - kodującego mięśniową izoformę kinazy kreatynowej. Zmiany były natomiast widoczne w przypadku czynników miogennych *Myod1* (od piątego do dziewiątego dnia hodowli) i *Myf5* (niewielki wzrost jedynie w dziewiątym dniu tygodniu hodowli), a także *Pcna*, kofaktora jednej z polimeraz DNA. Wykazano również zmiany w ekspresji genów kodujących ciężkie łańcuchy miozyn mięśniowych - *Myh3* i *Myh7*, odpowiednio - embrionalnej i tzw. wolnej (typ I), znanej również jako izoforma β miozyn występujących w mięśniu sercowym, które były najbardziej widoczne w dziewiątym dniu hodowli. Doktorantka odnosi się do tych obserwacji w Dyskusji, mnie natomiast zabrakło informacji, dlaczego te doświadczenia przeprowadzono w niskim, 3 μM, stężeniu β-escyny, a nie w stężeniu 20 μM, które nie było jeszcze cytotoksyczne a przy którym widoczne były największe zmiany w morfologii powstających mikrotubul. Uwaga ta jest o tyle zasadna, że kolejne doświadczenia na mioblastach były prowadzone również w 20 μM stężeniu tego związku.

W kolejnym cyklu doświadczeń Doktorantka wykazała, że wprawdzie sama β-escyna nie stymuluje translokacji do jądra (aktywacji) podjednostek czynnika transkrypcyjnego NFκB, to jej obecność obniża wywołaną przez TNFα aktywację podjednostki p65 tego czynnika. Jest to dobroczynny efekt, gdyż długotrwała aktywacja NFκB prowadzi do upośledzenia regeneracji mięśni i w konsekwencji do szeregu miopatii.

Następnie Doktorantka zbadała, jaki jest wpływ β-escyny na wydzielanie metaloproteinaz, MMP2 i MMP9, ważnych składowych w procesie regeneracji mięśni, acz ich nadmierna aktywność upośledza regenerację. Przesłanką do badań były również obserwacje uzyskane w zespole prof. Koziak, że β-escyna zwiększa poziom metaloproteinazy 14 w komórkach śródbłonka naczyń. Doktorantka wykazała, że zależne od TNFα i β-escyny zmiany są widoczne w przypadku MMP9, a nie MMP2. Cytokina powodowała znaczący wzrost sekrecji MMP9 w każdym z badanych punktów czasowych hodowli, natomiast dodatek β-escyny, zwłaszcza stężeniu 20 μM, obniżał podwyższony przez TNF poziom sekrecji tej metaloproteinazy, acz nie do poziomu kontrolnego. Efekt był zwłaszcza widoczny w piątym i siódmym dniu hodowli, wówczas gdy dominują procesy fuzji mioblastów.

Kolejny problem, którym Doktorantka zajęła się, to określenie, czy i jak β-escyna wpływa na aktywność ALDH, enzymu, którego wysoka aktywność w występuje w komórkach satelitowych o podwyższonej aktywności. Uzyskane przez nią wyniki wykazały, że β-escyna zwiększa prawie

Pracownia Molekularnych Podstaw Ruchów Komórkowych
Instytut Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego, Polska Akademia Nauk
ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa
tel.: (+48 22) 58 92 456, email: j.redowicz@nencki.gov.pl
www.nencki.gov.pl

dwukrotnie aktywność ALDH, co może świadczyć o zwiększeniu potencjału regeneracyjnego tak traktowanych komórek.

Badania nad wpływem β-escyny na regenerację mięśni rozpoczęła Doktorantka od wykazania, że po 14 dniach od nastrzyknięcia kardiotoksyną masa obu mięśni, *soleus* i EDL, wzrosła przy podawaniu β-escyny. Zabrakło mi tu jednak dodatkowej kontroli, a mianowicie mięśni, które nastrzyknięto roztworem, w którym podawana była kardiotoksyna. Na marginesie, jak podana zwierzętom dawka tego związku ma się do stężeń stosowanych w hodowli mioblastów. W kolejnych badaniach Doktorantka wykazała, że β-escyna zwiększa zawartość (i pole powierzchni) włókien mięśniowych w uszkodzonym mięśniu, zmniejsza zawartość tkanki łącznej oraz obniża nasilenie stanu zapalnego. Zaobserwowała również większą liczbę włókien z prawidłowo położonymi jądrami komórkowymi, co było widoczne w mięśniu EDL.

Następnie, podobnie jak w przypadku mioblastów, Doktorantka zbadała wpływ β-escyny na ekspresję genów związanych z regeneracją mięśni i zaobserwowała różnice pomiędzy oboma typami mięśni, co zapewne wynikało z odmiennego przebiegu ich regeneracji. Mam pytanie do tej części doświadczeń, a mianowicie dlaczego w mięśniu EDL Doktorantka obserwowała w obecności β-escyny w 14. dniu po uszkodzeniu obniżony poziom transkryptów dla łańcuchów ciężkich wolnej i szybkiej miozyny, podczas gdy te mięśnie "wyglądały" dużo lepiej w stosunku do tych traktowanych samą toksyną. Doktorantka zaobserwowała również spadek liczby makrofagów prozapalnych oraz wzrost makrofagów przeciwzapalnych (zwłaszcza w mięśniu *soleus* po 3 dniach od nastrzyknięcia kardiotoksyną). Ponadto, β-escyna powodowała dodatkowy wzrost aktywności metaloproteinaz w tym mięśniu, co dodatkowo wskazuje na odmienność przebiegu regeneracji w obu typach mięśni.

Dyskusja jest podzielona na podrozdziały, w których Doktorantka odnosi się do wyników uzyskanych w poszczególnych cyklach doświadczeń. Miejscami Dyskusja jest "przegadana", zbyt dużo jest w tej części rozprawy informacji podstawowych, które mogłyby znaleźć się we Wstępie, np. te dotyczące procesu aktywacji komórek satelitowych. Tym niemniej dobrze się ją czyta, a jej lektura wskazuje na dobrą znajomość zagadnień związanych z tematyką rozprawy i umiejętność wyciągania właściwych wniosków, a także zdolnością do krytycznej analizy własnych obserwacji w oparciu o dane literaturowe.

W **Podsumowaniu** Doktorantka w sposób opisowy dokonuje syntezy swoich obserwacji, przedstawiając je w formie informatywnego schematu oraz wskazuje na możliwe zastosowania aplikacyjne swoich badań. Osobiście wolałabym, aby to podsumowanie było przedstawione w formie punktów.

Podsumowanie

Rozprawa doktorska Pani mgr Marii Sikorskiej ma dużą wartość poznawczą, a w przyszłości niewątpliwie potencjał aplikacyjny. Jej badania wskazują bowiem na nowy, potencjalny mechanizm zaangażowania β-escyny w przyspieszenie procesów regeneracji uszkodzonych mięśni szkieletowych i jej nowe wskazania w klinice. Analiza rozprawy wskazuje, że Doktorantka posiada

Pracownia Molekularnych Podstaw Ruchów Komórkowych
Instytut Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego, Polska Akademia Nauk
ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa
tel.: (+48 22) 58 92 456, email: j.redowicz@nencki.gov.pl
www.nencki.gov.pl

nie tylko ugruntowaną wiedzę teoretyczną, a również umiejętność do samodzielnego prowadzenia badań naukowych.

W toku dobrze zaplanowanych nowatorskich badań z wykorzystaniem bogatego warsztatu metodycznego Doktorantka uzyskała wyniki potwierdzające wysuniętą przez nią hipotezę o pozytywnym bezpośrednim wpływie β-escyny na regenerację mięśni szkieletowych. Wykazała, że β-escyna hamuje aktywację podjednostek czynnika transkrypcyjnego NFκB, łagodzi odpowiedź komórek satelitowych na działanie cytokiny prozapalnej TNFα, zwiększa aktywność ALDH w tych komórkach (potencjalnie zwiększając ich zdolność do różnicowania), moduluje skład makrofagów, napływających do uszkodzonej tkanki, zwiększając pulę makrofagów przeciwzapalnych oraz wpływa na syntezę MMP9, metaloproteinazy ważnej w procesach związanych z przebudową macierzy pozakomórkowej, również w tkance mięśniowej. Co więcej, Doktorantka wykazała, że pozytywny efekt β-escyny jest szczególnie widoczny w mięśniu *soleus*, zbudowanym przede wszystkim z włókien wolnokurczących się, który w dużo mniejszym stopniu jest zdolny do regeneracji. Mam nadzieję, że te interesujące wyniki zostaną wkrótce opublikowane.

W mojej ocenie rozprawa doktorska mgr Marii Sikorskiej spełnia warunki określone w Art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.). Biorąc pod uwagę powyższe, przedkładam Radzie Wydziału Nauk o Zdrowiu wniosek o dopuszczenie mgr Marii Sikorskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego w celu uzyskania przez nią stopnia doktora w dziedzinie nauk o zdrowiu, mam jednak świadomość, że nadanie nastąpi w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki o zdrowiu.

Rędowicz

Maria Jolanta Rędowicz

Pracownia Molekularnych Podstaw Ruchów Komórkowych 6
Instytut Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego, Polska Akademia Nauk
ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa
tel.: (+48 22) 58 92 456, email: j.redowicz@nencki.gov.pl
www.nencki.gov.pl